



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**Efeito do consumo de proteína do soro do leite bovino,
parcialmente hidrolisada e da atividade física em
proteases intestinais do rato**

Ana Cláudia Coelho Nery Diez
Nutricionista

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
Orientador

Campinas, 2007



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**Efeito do consumo de proteína do soro do leite bovino,
parcialmente hidrolisada e da atividade física em
proteases intestinais do rato**

Ana Cláudia Coelho Nery Diez
Nutricionista

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
Orientador

Dissertação apresentada a
Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção do título de mestre
em Alimentos e Nutrição.

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Diez, Ana Cláudia Coelho Nery
D568e Efeito do consumo de proteína do soro do leite bovino,
parcialmente hidrolisada e da atividade física em proteases
intestinais do rato / Ana Cláudia Coelho Nery Diez. --
Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Jaime Amaya-Farfán
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Soro do leite. 2. Atividade física. 3. Digestão. 4. Proteases.
5. Intestino. I. Amaya-Farfán, Jaime. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Ttulo em inglês: Effect of the intake of partially hydrolyzed bovine milk whey protein and physical activity on the intestinal proteases of the rat.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Milk whey, Physical activity, Digestion, Proteases, Intestine

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Jaime Amaya-Farfán

Valdemiro Carlos Sgarbieri

Everardo Magalhães Carneiro

Semíramis Martins Álvares Domene

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán

(Orientador) FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

(Membro) FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

(Membro) IB/UNICAMP

Prof. Dra. Semíramis Martins Álvares Domene

(Membro) PUC-Campinas

AGRADECIMENTOS

Agradeça a minha família pelo apoio e incentivo dados no decorrer deste projeto.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, especialmente o departamento de Alimentos e Nutrição pela oportunidade profissional.

À CAPES pelo apoio financeiro

Ao Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán, pelo apoio e dedicação na competente orientação deste trabalho, assim como os ensinamentos científicos.

À Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo, por ter cedido o espaço e a esteira na Faculdade de Biologia/UNICAMP e junto com seus orientados ter proporcionado ensinamentos científicos.

Aos meus amigos de turma e de laboratório, Iara, Elisa, Elisvânia, Pablo, Telma, Cinthia, Éder, Thony, Giovana e Carla.

Agradeço em especial a Iara e a Maria Inês, pelo companheirismo e ensinamentos no desenvolvimento do projeto.

A todos, que de uma forma ou de outra, contribuíram para realização deste trabalho.

ÍNDICE

Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Figura.....	vii
Apêndice.....	ix
Resumo.....	x
Summary.....	xii
Introdução Geral.....	1
Referências Bibilográficas.....	6
Capítulo 1.....	9
Revisão da Literatura.....	11
1.1 Papel da Proteína.....	11
1.2 Proteínas nos Alimentos.....	12
1.3 Digestão das Proteínas.....	13
1.4 Fases de Absorção.....	15
1.5 Peptídeos Transportadores.....	16
1.6 Glutaminase no Trato Intestinal.....	17
1.7 Metabolismo Protéico.....	17
1.8 Valor Nutricional do Leite.....	18
1.9 Obtenção do Soro do Leite.....	18
1.10 Soro do Leite: Estrutura e Função.....	19
1.11 Grau de Hidrólise.....	22
1.12 Utilização do Soro do Leite.....	23
1.13 Digestão do Leite.....	24

ÍNDICE

1.14 Aminoácidos de Cadeia Ramificada.....	24
1.15 Glutamina.....	25
1.16 Glutathione.....	26
1.17 Mecanismo de Adiposidade.....	26
1.18 Mecanismo de Saciedade.....	27
1.19 Mecanismo de Anabolismo Muscular.....	28
1.20 Proteína e Desempenho Atlético.....	29
1.21 Aplicações Terapêuticas.....	31
1.22 Conclusão.....	34
1.23 Referências Bibliográficas.....	35
Capítulo 2.....	45
Efeito do consumo da proteína do soro do leite pré-hidrolisada e a atividade física de ratos na atividade catalítica de proteases intestinais.....	47
Resumo.....	47
2.1 Introdução.....	49
2.2 Material e Métodos.....	53
2.2.1 Material.....	53
2.2.2 Animais.....	53
2.2.3 Dietas.....	53
2.2.4 Protocolo de Treinamento e Exaustão.....	55
2.2.5 Preparação do Conteúdo Luminal da Fração Intestinal.....	56
2.2.6 Determinação da Atividade Enzimática.....	57

ÍNDICE

2.2.7 Determinação de Aminoácidos por Cromatografia Líquida.....	59
2.3 Análise Estatística.....	60
2.4 Resultados e Discussão.....	61
2.5 Conclusão.....	73
2.6 Referências Bibliográficas.....	75
Capítulo 3.....	83
Absorção de produtos da hidrólise de proteínas no intestino do rato exercitado.....	85
Resumo.....	85
3.1 Introdução.....	87
3.2 Material e Métodos.....	90
3.2.1 Material.....	90
3.2.2 Animais.....	90
3.2.3 Dietas e Balanço Nitrogenado.....	90
3.2.4 Protocolo de Treinamento e Exaustão.....	92
3.2.5 Preparação da Fração Intestinal.....	93
3.2.6 Eletroforese Capilar.....	94
3.2.7 Determinação de Aminoácidos Livres pro Cromatografia Líquida.....	94
3.2.8 Mensuração de Peptídeos por Cromatografia Líquida.....	95
3.3 Resultados e Discussão.....	96
3.4 Conclusão.....	109
3.5 Referências Bibliográficas.....	110
Apêndice.....	115

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1.1 Descrição dos aminoácidos indispensáveis, dispensáveis, condicionalmente indispensáveis e os precursores dos condicionalmente indispensáveis na dieta humana.....	12
Tabela 2.1 Composição centesimal das dietas experimentais (base úmida).....	55
Tabela 2.2 Tempos de exaustão física para os três tipos de dieta, nos regimes de treinamento e sedentarismo.....	63
Tabela 2.3 Atividade das proteases nas frações intestinais, jejuno e íleo de ratos alimentados com caseína, isolado e hidrolisado do soro do leite, em diferentes níveis de atividade física.....	70
Tabela 3.1 Composição centesimal das dietas experimentais (base úmida).....	92

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema de digestão e absorção intracelular de peptídeos.....	16
Figura 2.1 Esquema da distribuição dos ratos no experimento.....	54
Figura 2.2 Esquema do protocolo de treinamento.....	56
Figura 2.3 Comparação dos perfis de aminoácidos indispensáveis e condicionalmente indispensáveis das fontes protéicas utilizadas no experimento.....	62
Figura 2.4 Efeito das proteínas presentes na dieta e da atividade física na atividade da glutaminase intestinal.....	66
Figura 3.1 Esquema da distribuição dos ratos no experimento.....	91
Figura 3.2 Esquema do protocolo de treinamento.....	93
Figura 3.3 Evolução ponderal dos animais alimentados com três diferentes fontes protéicas durante cinco semanas de experimento.....	96
Figura 3.4 Análise eletroforética nos líquidos intestinais, interno e externo (perfusado), do grupo treinado.....	98
Figura 3.5 Relação dos perfis de aminoácidos livres coletados do interior e exterior de alças intestinais, após infusão com o <u>isolado</u> do soro do leite. As alças foram extraídas de animais que tinham sido alimentados durante cinco semanas com isolado e pertenciam ao grupo sedentário e sedentário-exausto.....	100
Figura 3.6 Relação dos perfis de aminoácidos livres coletados do interior e exterior de alças intestinais, após infusão com o <u>isolado</u> do soro do leite. As alças foram extraídas de animais que tinham sido alimentados durante cinco semanas com isolado e pertenciam ao grupo treinado e treinado-exausto.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.7 Relação dos perfis de aminoácidos livres coletados do interior e exterior de alças intestinais, após infusão com o <u>hidrolisado</u> do soro do leite. As alças foram extraídas de animais dos grupos sedentários e sedentários-exaustos, que tinham sido alimentados durante cinco semanas com hidrolisado.....	102
Figura 3.8 Relação dos perfis de aminoácidos livres coletados do interior e exterior de alças intestinais, após infusão com o <u>hidrolisado</u> do soro de leite. As alças foram extraídas de animais dos grupos treinados e treinados-exaustos, que tinham sido alimentados durante cinco semanas com o hidrolisado.....	104
Figura 3.9 Perfil aminoacídico dos possíveis peptídeos perfusados através do intestino. Perfil diferencial de aminoácidos resultante de subtrair os aminoácidos livres dos totais contidos nos líquidos interno (I) e externo (E) das alças intestinais infundidas com isolado e hidrolisado. Os animais haviam sido alimentados com <u>isolado</u> e hidrolisado, respectivamente, durante cinco semanas.....	107

APÊNDICE

Tabela 1 A formulação-base da dieta foi a AIN 93-G, modificada para conter 12% de proteína, sendo utilizados como fonte protéica o isolado do soro do leite, seu hidrolisado e a caseína.....	115
Tabela 2 Composição da mistura vitamínica (AIN-93G) utilizada na preparação das dietas experimentais.....	116
Tabela 3 Composição da mistura mineral (AIN-93G) utilizada na preparação das dietas experimentais.....	117
Certificado Comissão de Ética na Experimental Animal	118

Efeito do consumo de proteína do soro do leite bovino, parcialmente hidrolisada e da atividade física em proteases intestinais do rato

RESUMO

As proteínas do soro do leite apresentam propriedades fisiológicas, funcionais e nutricionais diferentes que resultam na modulação ou melhoramento de funções bioquímicas e fisiológicas, aumentando a resistência e protegendo o organismo contra infecções ou retardando certos processos patológicos, assim como melhorando o desempenho físico. Estudos têm demonstrado melhoras em parâmetros bioquímicos e físicos proporcionados por estas proteínas. Assim, considerou-se de interesse investigar algumas das possíveis alterações ou efeitos fisiológicos, provocados pela ingestão de fonte protéica de alto peso molecular (isolado do soro do leite) e um hidrolisado enzimático dessa proteína. Além disso, levou-se em consideração o efeito da atividade física em ratos treinados em esteira, na atividade catalítica de proteases intestinais como: glutaminase, leucina-aminopeptidase, quimotripsina e tripsina e verificou-se também a possível absorção de peptídeos que constituem o hidrolisado, no intestino delgado. Na análise das atividades enzimáticas observou-se que o consumo da proteína hidrolisada promoveu diminuição da atividade da enzima glutaminase intestinal de 25 a 29%, em relação à atividade produzida pelas proteínas intactas (isolado e caseína). O treinamento, porém, teve como efeito aumentar a atividade glutaminase entre 27 e 32% para cada uma das dietas, exceto para o hidrolisado, que permaneceu sem alteração. A exaustão, por outro lado, resultou em diminuição da atividade glutaminase intestinal para quase todas as dietas (média aproximada de 30%). Na avaliação das enzimas presentes no lúmen intestinal, as atividades das três proteases, leucina-aminopeptidase, quimotripsina e tripsina, foram encontradas mais elevadas na fração do jejuno, em comparação ao íleo. Foi observada uma aparente inibição enzimática da tripsina na fração jejunal pela presença de caseína. Para verificar a possibilidade de absorção de peptídeos inteiros, foi realizada uma análise *in vitro* com os

intestinos delgados. O intestino fresco extraído foi infundido com uma suspensão de cada proteína e incubado em solução fisiológica por duas horas, na temperatura de 37°C. Após, tal procedimento, os perfis de aminoácidos e de peptídeos perfusados foram obtidos por métodos cromatográficos e eletroforéticos. Neste estudo, pode-se constatar que houve maior passagem de aminoácidos nos intestinos delgados dos grupos sedentários-exaustos e treinados, que foram infundidos com o hidrolisado e nos grupos sedentários e treinados, que foram infundidos com isolado. Em relação aos diferentes níveis de atividade física, os animais treinados, alimentados com ambas as dietas, isolado e seu proteolísado, tiveram maior passagem de aminoácidos. Conclui-se que o consumo da proteína parcialmente hidrolisada não afetou de igual forma a atividade das três proteases, tripsina, quimotripsina e leucina-aminoptidase, sendo que o treinamento e o hidrolisado, conjuntamente, redundaram em diminuição da atividade da quimotripsina, enquanto que a atividade da glutaminase foi visivelmente diminuída pela combinação da exaustão e o consumo do hidrolisado. Por sua vez, foi possível evidenciar a passagem de peptídeos do hidrolisado, do interior, para o exterior do jejuno perfusado do rato.

Palavras-Chave: Soro do leite; atividade física; digestão; proteases e intestino.

Effect of the intake of partially hydrolyzed bovine milk whey protein and physical activity on the intestinal proteases of the rat

SUMMARY

The whey protein offers various physiological, functional and nutritional properties that result in the modulation or improvement of physiological and biochemical functions, thus protecting the body against infections and delaying the onset of certain pathological processes, as well as improving the physical performance. Researchers have attributed to these proteins benefits such as the improvement of biochemical and physical parameters of the exercising animal. Therefore, it was considered of interest investigate some of the possible alterations resulting from the ingestion of the milk whey proteins (whey protein isolate) as the only source of high-molecular weight protein, as compared to an intermediate-degree enzymatic hydrolyzate of this protein and the casein standard. Moreover, the effect of the physical activity on the catalytic activity of the intestinal proteases glutaminase, leucine-aminopeptidase, chymotrypsin and trypsin, of rats trained in the treadmill was taken as an additional variable. Moreover, the possible absorption of constituent peptides of the hydrolyzate from the small intestine was investigated. In the analysis of the enzymatic activities it was observed that the consumption of the hydrolyzed protein prompted a reduction of the activity of the intestinal enzyme glutaminase by 25 to 29%, in relation to the activity produced by the unbroken proteins (isolate and casein). Physical training, however, had the effect of increasing the activity of glutaminase between

27 and 32% for each one of the diets, except for the hydrolyzate, which remained unaltered. Exhaustion, on the other hand, resulted in the reduction of the intestinal activity glutaminase for most of the diets (mean of ~30%). Assessment of the enzymes present in the intestinal lumen, the activities of three proteases, leucine-aminopeptidase, chymotrypsin and trypsin, were higher in the jejunal fraction, in comparison to the ileum. An apparent enzymatic inhibition of trypsin occurred in the jejunal fraction in the presence of casein. In order to verify the possibility of absorption of whole peptides, fresh intestinal fractions were infused with suspensions of each protein and incubated in physiological solution for two hours, at 37°C. After, such process the amino acid and peptide profiles were determined by chromatographic procedures. It was observed that a greater outflow amino acids occurred in the intestines sedentary-exhaust and trained group that were infused with the hydrolyzate, and in the sedentary and trained group that were infused with whey protein isolate. With regard to the effect of the different levels of physical activity, the animals that underwent training, fed with either of the diets, isolate or its hydrolyzate, had greater amino acid outflow than the sedentary animals. It is concluded that consumption of the hydrolyzate did not affect equally the activity of the three proteases, trypsin, chymotrypsin and leucine-aminopeptidase, noticing that a combination between training and the hydrolyzate caused a decrease of the activity of chymotrypsin, whereas the activity of glutaminase was clearly diminished by a combination between exhaustion and consumption of the hydrolyzate. Evidence has been presented showing that infusion of the hydrolyzate into the small intestine of the rat results in the passage of peptides from the interior to the exterior of the intestinal wall.

Key Words: Milk whey; physical activity; digestion; proteases and intestine.

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

A degradação das proteínas, mediante o processo de digestão, sempre foi considerada como um meio indispensável para o organismo obter os aminoácidos necessários para a construção dos tecidos. Como chave principal deste processo, está o intestino, o qual pode ser considerado como o órgão da nutrição, devido a sua função de assimilar nutrientes, a fim de manter as funções do organismo.

A nutrição apropriada constitui um alicerce para o desempenho das funções vitais, proporcionando o combustível para o trabalho biológico. As proteínas constituem uma classe de nutrientes essenciais para quase todas as funções do corpo humano. Exemplo disso é observado com o soro do leite, um subproduto que até pouco tempo era descartado pela a indústria de queijos, se tornou alimento graças a pesquisas que demonstraram seu alto valor biológico e potencial para diversas aplicações tecnológicas (WIT, 1998). Estes estudos constataram que as proteínas do soro lácteo possuem excelentes benefícios para saúde, inclusive contra alguns processos patológicos. Dentre estas funções, destacam-se: atividade antihipertensiva (PINS e KEENAN, 2006), atividade anticâncer (BOUNOUS, 2000), atividade imunomoduladora (DIAS et al., 2006), atividade antiúlcera (ROSANELI et al., 2002) e proteção ao sistema cardiovascular (BARTFAY et al., 2003).

Além do seu alto valor biológico, estas proteínas são consideradas de rápida digestão e absorção, devido ao curto tempo de esvaziamento gástrico (BORIE et al., 1997). Este fato proporciona, conseqüentemente, aumento de matéria-prima para a síntese de

proteínas (ANTHONY et al., 2001), aumento da saciedade (HALL et al., 2003), redução do acúmulo de gordura pelo tecido adiposo (ZEMEL et al., 2000; ZEMEL, 2003), melhora no desempenho físico (PIMENTA et al., 2006; MORIFUJU et al., 2005), entre outros benefícios.

Há um elo natural entre nutrição e fisiologia do exercício, no qual, recentemente, o uso de proteínas e aminoácidos tem sido difundido largamente entre os praticantes de atividade física, tornando-se objeto de estudo para vários pesquisadores. O perfil de aminoácidos das proteínas do soro, principalmente ricas em leucina, pode favorecer o anabolismo muscular (ANTHONY et al., 2001). Além disso, Há e Zemel (2003) destacam que o perfil de aminoácidos das proteínas do soro é muito similar ao das proteínas do músculo esquelético, fornecendo quase todos os aminoácidos em proporção similar às do mesmo, classificando-as como um efetivo suplemento anabólico. Verificados os efeitos positivos e benéficos do soro do leite na fisiologia de animais experimentais e de humanos, foi interesse dessa pesquisa analisar alguns dos eventos bioquímicos relacionados com possíveis alterações nos processos de digestão e absorção de peptídeos, em ratos exercitados.

Assim, considerou-se o interesse pela investigação de algumas das possíveis alterações ou efeitos fisiológicos, como as atividades de proteases intestinais, ao se ingerir uma fonte protéica de alto peso molecular (o isolado do soro do leite) e um hidrolisado enzimático dessa proteína, utilizando ratos. Os animais foram também submetidos a treinamento físico rotineiro, sendo a metade deles levados à exaustão, no final. É importante salientar que as fontes protéicas continham os mesmos aminoácidos, apenas diferindo no seu estado físico-químico. Neste mesmo trabalho, foi realizado um

experimento exploratório para avaliar o processo de absorção de peptídeos no intestino delgado.

O presente trabalho está dividido em três capítulos. O primeiro aborda uma revisão da literatura sobre o processo de digestão e absorção das proteínas, com destaque para as do soro do leite e para suas principais funções fisiológicas. O segundo trata sobre a ação da proteína do soro do leite na dieta e atividade física em proteases intestinais em ratos treinados. O terceiro aborda a ação da infusão de duas fontes protéicas no intestino de ratos exercitados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; KIMBAL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Signaling pathways involved in translation control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **The Journal Nutrition**, v.131, n.3, p.856-860, 2001.
2. BARTFAY, W.J.; DAVIS, M.T.; MEDVES, J.M.; LUGOWSKI, S. Milk whey protein decreases oxygen free radical production in a murine model of chronic iron-overload cardiomyopathy. **The Canadian Journal of Cardiology**, v.19, n.10, p.1163-1168, 2003.
3. BORIE Y.; DANGIN, M.; GACHON, P.; VASSON, M.; MAUBOIS, J.; BEAUFRERE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.94, p.14930-14935, 1997.
4. BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, v.20, n.6, p.4785-5792, 2000.
5. DIAS, N.F.G.P.; SGARBIERI, V.C.; JACOBUCCI, H.B.; RANGEL, H.A.; TANIKAWA, C. Dietary protein, immune function and colon carcinogenesis in the mouse. **Dairy Science and Technology**, v.86, p.213-226, 2006.
6. HÁ, E.; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.14, n.5, p.251-258, 2003.
7. HALL, W.L.; MILLWARD, D.J.; LONG, S.J.; MORGAN, L.M. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. **British Journal of Nutrition**, v.89, p.293-248, 2003.

8. MORIFUJI, M.; SAKAI, K.; SANBONGI, C.; SUGIURA, K. Dietary whey protein increases liver and skeletal muscle glycogen levels in exercise-trained rats. **The British Journal of Nutrition**, v.32, p.493-445, 2005.
9. PIMENTA, F.M.V.; ABECIA-SORIA, M.I.; AULER, F.; AMAYA-FARFÁN, J. Physical performance of exercise young rats fed hydrolysed whey protein at a sub-optimal level. **International Dairy Journal**, v.16, p.984-991, 2006.
10. PINS, J.J.; KEENAN, J.M. Effects of whey peptides on cardiovascular disease risk factors. **Journal of Clinical Hypertension**, v.8, n.11, p.775-782, 2006.
11. ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, M.A.; ANTONIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI, V.C. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. **Journal of Medicinal Food**, v.5, n.4, p.221-228, 2002.
12. WIT, J.N. Nutrition and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.597-608, 1998.
13. ZEMEL, M.B. Mechanisms of dairy modulation of adiposity. **The Journal of Nutrition**, v.133, p.252-256, 2003.
14. ZEMEL, M.B.; SHI, H.; GREER, B.; DIRIENZO, D.; ZEMEL, P.C. Regulation of adiposity by dietary calcium. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.14, p.1132-1138, 2000.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Papel da Proteína

As proteínas são unidas por ligações peptídicas, polímeros de aminoácidos, detentoras de seqüências que podem conferir atividades metabólicas específicas. Elas desempenham papéis importantes nos processos biológicos, atuando como enzimas, neurotransmissoras, transportadoras nas membranas celulares e no O_2 entre outros. As proteínas podem também ser utilizadas como fonte de energia, mas esta não é sua função principal. Para serem utilizadas pelo organismo é preciso antes, digeri-las, metabolizá-las, resultando, assim, em aminoácidos. Existem 20 aminoácidos, nove são indispensáveis, pois não sintetizados (treonina, triptofano, histidina, lisina, leucina, isoleucina, metionina, valina e fenilalanina) (Tabela 1.1). A falta de um deles acarreta um comprometimento na síntese de novos tecidos (OTTEN, J.J. et al., 2006).

Tabela 1.1. Descrição dos aminoácidos indispensáveis, dispensáveis, condicionalmente indispensáveis e os precursores dos condicionalmente indispensáveis na dieta humana.

Indispensáveis	Dispensáveis	Condicionalmente Indispensáveis	Precursores dos condicionalmente Indispensáveis
Histidina*	Alanina	Arginina	GluN/Glu; Asp
Isoleucina	Ácido Aspártico	Cisteína	Metionina; Serina
Leucina	Asparagina	Glutamina	Ácido Glutâmico/ NH ₄
Lisina	Ácido Glutâmico	Glicina	Serina; Colina
Metionina	Serina	Prolina	Glutamato
Fenilalanina		Tirosina	Fenilalanina
Treonina			
Triptofano			
Valina			

*perda de peso verificável só depois de um tempo de alimentação deficiente.

1.2 Proteínas nos Alimentos

O principal papel do alimento é fornecer ao corpo energia e nutrientes necessários tanto para funções fisiológicas como bioquímicas. Os alimentos que compõem a dieta humana são de origem vegetal e animal e, seus valores nutricionais dependem da concentração e do balanço dos nutrientes, da biodisponibilidade dos nutrientes e da presença de componentes tóxicos e/ou antinutricionais, além de outros fatores.

O valor nutricional das proteínas depende de seu perfil de aminoácidos indispensáveis, e de sua digestibilidade. Esta representa a medida das porcentagens das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo na forma de aminoácidos. (SGARBIERI, 1987). O escore químico, análise química que determina a composição de aminoácidos de uma proteína, é uma técnica barata e rápida, cujo valor é comparado com o padrão de aminoácidos de referência. O valor obtido por

meio desta comparação é corrigido pela digestibilidade protéica, obtendo então, o escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS). Assim, a qualidade da proteína avaliada pelo escore químico, é baseada no aminoácido limitante, no qual os valores maiores que 1,0, significa uma proteína de boa qualidade, contendo aminoácidos essenciais capazes de suprir as necessidades para dieta humana (HENLEY e KUSTER, 1994).

Segundo os autores Blanco e Bressani (1991), a qualidade da proteína refere-se à sua capacidade de satisfazer as necessidades nutricionais do organismo visando o crescimento, a manutenção e a reparação, mediante o fornecimento de aminoácidos essenciais e não essenciais, para fins de síntese protéica.

1.3 Digestão das Proteínas

A função global do sistema gastrointestinal é processar os alimentos ingeridos até formas moleculares que possam ser assimiladas pelo organismo. O intestino delgado, o qual divide-se em duodeno, jejuno e íleo é o local primário para a digestão de alimentos e de nutrientes. A maior parte do processo digestivo é completa-se no duodeno e no jejuno, os quais sofrem ação de secreções do pâncreas e do trato biliar.

O processo de degradação das proteínas inicia-se no estômago, onde ocorre a liberação do pepsinogênio, o qual é ativado em pH ácido, leva à desnaturação das proteínas e à hidrólise por ação da pepsina. A digestão no estômago representa apenas de 10 a 20% da digestão protéica total. O contato do quimo com a mucosa intestinal estimula a liberação

da enterocinase, enzima que transforma o tripsinogênio pancreático inativo em tripsina ativa que, por sua vez, ativa as outras enzimas proteolíticas pancreáticas.

As proteases que atuam nesta região são divididas em três grupos: endopeptidases, exopeptidases e aminopeptidases. As endopeptidases agem sobre as ligações peptídicas das cadeias proteolíticas. As exopeptidases podem ser carboxipeptidases, que atuam no extremo carboxílico da cadeia, retirando um resíduo de aminoácido, e aminopeptidases, que removem os resíduos aminoacídicos da região amino-terminal da cadeia (WHITCOMB e LOWE, 2007).

O pâncreas secreta enzimas capazes de digerir todos os principais nutrientes. Dessas, as principais enzimas proteolíticas são: tripsina, quimotripsina, carboxipeptidases e elastases. A tripsina, quimotripsina e as elastases são endopeptidases e quebram as ligações peptídicas em locais específicos e não terminais. A tripsina hidrolisa somente quando o grupo carbonil da ligação peptídica é fornecido por uma lisina ou pela arginina, e a quimotripsina hidrolisa as ligações peptídicas dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano e tirosina (HEDSTROM, 1996).

As liberações e as ativações dos zimogênios pancreáticos são mediadas pela secreção dos hormônios colecistocinina e secretina. Esta estimula a liberação de bicarbonato, cujo objetivo é o de neutralizar o pH ácido vindo do estômago. Já a colecistocinina estimula a secreção enzimática do pâncreas, e sua secreção é estimulada pela entrada de ácidos graxos e proteínas que chegam no duodeno (NELSON e COX, 2002).

A hidrólise é completada na luz intestinal por enzimas secretadas pelos enterócitos, os quais consistem em centenas de microvilosidades. As enzimas são as aminopeptidases,

produzidas pelo citoplasma e secretadas pela mucosa do intestino delgado, resultando em aminoácidos e em peptídeos prontos para absorção. A velocidade de passagem do alimento pelo trato digestivo influencia sua digestibilidade e conseqüentemente sua absorção (TSUJIMOTO , 1998).

1.4 Fases da Absorção

Após uma refeição contendo proteínas, há um grande acúmulo de dipeptídeos no lúmen intestinal. Estes podem ser absorvidos por dois diferentes caminhos: 1) os mesmos podem ser transportados intactos pelo citoplasma das células da mucosa, 2) ou podem ser quebrados a aminoácidos, por hidrolases, presentes na borda da membrana, e assim, serem transportados pelo citoplasma na forma de aminoácidos. A maioria destas dipeptidases está presente no citoplasma das células de mucosa, na borda em escova e são capazes de hidrolisar vários dipeptídeos. (KIM, 1972).

Outro transporte de oligopeptídeos é o cotransporte de H^+ , o qual tem capacidade de "bombear" uma substância contra gradiente de concentração (ou potencial eletroquímico) e, portanto, com gasto energético. A ótima função deste sistema incluiu um pH ácido nos vilos intestinais e um pH alcalino intracelular, que são mantidos pela ação de Na^+/H^+ , localizado na borda em escova da membrana. A ação de Na^+/K^+ - ATPase, localizada na membrana basolateral, mantém dentro da membrana um potencial negativo. A energia é obtida de modo indireto por meio do gradiente eletroquímico de íons ativamente transportados. Os oligopeptídeos transportados são reduzidos a aminoácidos por ação de peptidases citoplasmáticas, os quais são utilizados pelas células ou liberados na circulação

portal (Figura 1.1) (SIAMAK, 1997; ADIBIA, 2003). Os oligopeptídeos, que escapam da hidrólise pelas peptidases citoplasmáticas, são transportados pela membrana basolateral para circulação portal. Tal transporte é feito pelo Pept-1.

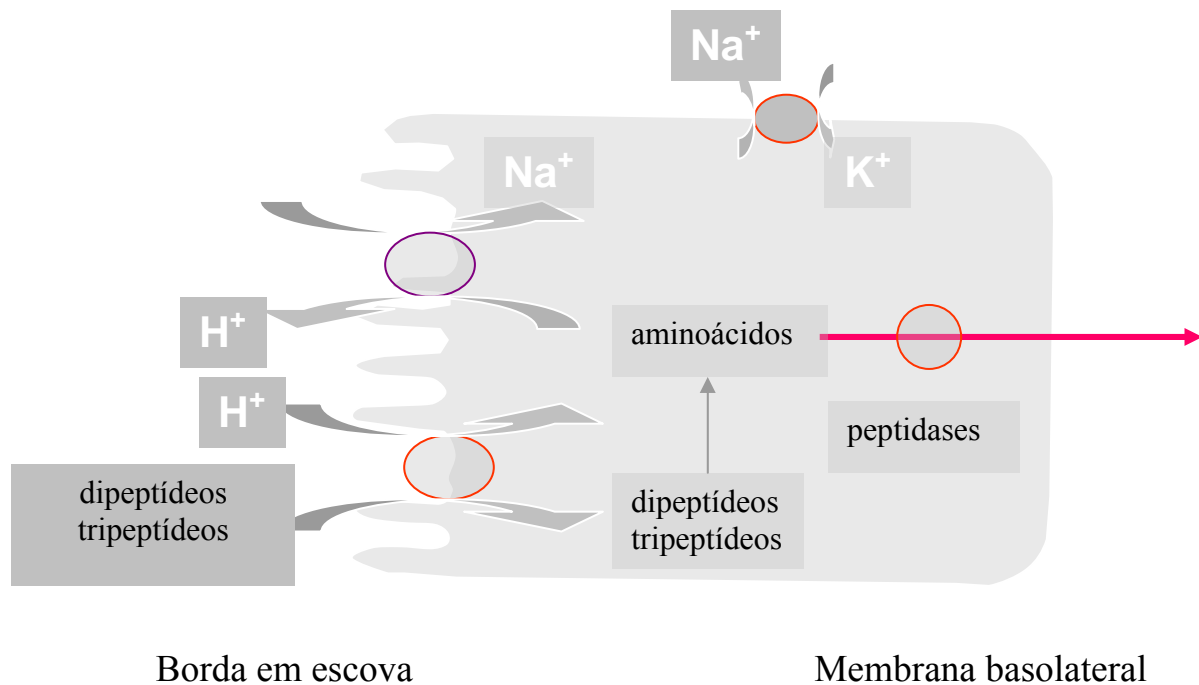


Figura 1.1. Esquema de digestão e absorção intracelular de peptídeos.

1.5 Peptídeos Transportadores

Os transportadores de peptídeos denominados PEPT-1 e PEPT-2 são acoplados aos peptídeos e H^+ , estão expressos preferencialmente no intestino e no rim. A abundância de PEPT-1, na membrana em borda em escova no epitélio intestinal, torna-o o mecanismo central para regulação e para transporte dos produtos da digestão protéica. (ADIBI, 1997).

1.6 Glutaminase no Trato Intestinal

O trato gastrintestinal é o principal órgão de utilização da glutamina, a qual é capturada nas células epiteliais dos vilos do intestino delgado. Os enterócitos, responsáveis por recobrirem o intestino, são as células de maior divisão celular no organismo. Eles necessitam de glicose e glutamina, para obtenção de energia e metabólitos, sendo necessário, para metabolização da glutamina, alto conteúdo de glutaminase. Os enterócitos captam, preferencialmente, a glutamina oriunda do lúmen, devido à maior capacidade de absorção deste aminoácido através da região apical dos enterócitos. É o sítio predominante do catabolismo de glutamina em vários estados fisiológicos (POMPÉIA, 2000).

1.7 Metabolismo Protéico

As proteínas não são permanentes em nosso organismo, as mesmas encontram-se em constante degradação e síntese. Os aminoácidos presentes nas células animais originam-se das proteínas da dieta (exógena) e das proteínas endógenas, as quais constituem assim um pool de aminoácidos. Este é utilizado para a síntese de proteínas endógenas e de outras moléculas que contenham nitrogênio (MARZZOCO, 1999).

De forma resumida, os principais sistemas bioquímicos envolvidos no metabolismo protéico, no organismo humano, são: captação e transporte de aminoácidos, degradação protéica, oxidação e catabolismo dos aminoácidos e síntese protéica. A degradação protéica compreende a remoção e a excreção do grupo amino que, após a sua remoção, resulta ainda na sua cadeia carbônica, denominada α -cetoácido. Existem vinte cadeias carbônicas, as quais não possuem uma via comum de degradação, assim, convergem para a produção de

apenas alguns compostos: piruvato, acetil-CoA ou intermediários do ciclo de Krebs (oxaloacetato, α -cetoglutarato, succinil-CoA e fumarato). A partir deste ponto, o metabolismo da cadeia carbônica dos aminoácidos confunde-se com as cadeias carbônicas dos ácidos graxos e dos carboidratos, e o fim destes α -cetoácidos dependerá do tecido e do estado fisiológico. Eles podem ser oxidados pelo ciclo de Krebs para fornecer energia ou serem utilizados pela via gliconeogênese, para produção de glicose ou para conversão a triacilgliceróis e serem armazenados. Para a síntese protéica, processo o qual requer a presença de todos os vinte aminoácidos na célula (MARZZOCO, 1999).

1.8 Valor Nutricional do Leite

As proteínas são componentes importantes dos alimentos, tanto pelo aspecto nutricional como pelo seu valor funcional. Diferem-se na composição pela forma de obtenção. O leite bovino contém aproximadamente 3,5% de proteínas, que podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais: 1) caseínas, 2) proteínas do soro, 3) proteínas das membranas dos glóbulos de gordura e 4) enzimas e fatores de crescimento (SGARBIERI, 2005). Em média, possuem 414 Kcal, 80g de proteína, 7g de gordura e 8g de carboidratos, correspondendo em 100g do concentrado protéico do soro do leite (SALZANO, 2002).

1.9 Obtenção do Soro do Leite

O soro do leite é um subproduto resultante da fabricação do queijo por coagulação da caseína, obtido por adição de ácidos ou por enzimas (soro doce). Ele possui elevado

valor nutricional, conferido pela presença de proteínas com alta concentração de aminoácidos indispensáveis, em especial, os aminoácidos sulfurados (WIT, 1998; Neves, 2001). Os aminoácidos presentes no soro excedem quase todas as doses recomendadas para todas as idades, com exceção aos aminoácidos aromáticos, que estão presente nas concentrações recomendadas (SGARBIERI, 2004)

As micelas de caseína podem ser separadas do soro do leite pelo uso de membranas, microfiltração (MF). A microfiltração do leite integral ou desnatado, em membranas com porosidade variando de 0,1 a 0,2 μm , permite a coleta de um permeado semelhante a do soro doce, porém mais cristalino e com qualidade bacteriológica satisfatória. Este soro doce pode sofrer purificação posterior por ultrafiltração, gerando um isolado protéico do soro com 96% de proteínas.

1.10 Soro do Leite: Estrutura e Função

As frações protéicas do leite agregam atributos nutricionais, funcionais e fisiológicos. Elas podem ser isoladas e utilizadas pela indústria farmacêutica e pela a de alimentos. O fracionamento desta matéria gera uma série de produtos para inúmeras aplicações: caseinatos, co-precipitados protéicos de caseína e soro, coágulo de caseína, soro ácido, soro doce, concentrados e isolados do soro do leite. O soro contribui com 20% de toda proteína do leite bovino e, o restante corresponde à caseína. Dentre as proteínas do soro destacam-se a β -lactoglobulina (β -Lg) e a α -lactalbumina (α -La). O restante das proteínas está presente em quantidades menores, que perfazem as imunoglobulinas, a

albumina bovina (BSA), a lactoferrina, as enzimas, a glicomacropeptídeo e as sub-frações de peptídeos.

- β -lactoglobulina

A β -lactoglobulina é a maior proteína do soro, correspondendo de 50 a 55% e o mais abundante. Ela possui peso molecular médio 18,4-36,8 KDa e representa, no leite bovino, cerca de 3,2g/L. Além disso, apresenta resistência à ação de ácidos e de enzimas presentes no estômago. Este peptídeo apresenta maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada e é um carreador de retinol (WIT, 1998).

- α -lactalbumina

A α -lactalbumina corresponde de 20 a 25% das proteínas do soro, é o segundo peptídeo do soro do leite bovino, mas o principal do leite humano (SHANNON et al., 2003). É um peptídeo de fácil e rápida digestão, com peso molecular de 14,2 KDa. Possui alto teor de triptofano (6%), quando comparado com outras fontes protéicas. É rica em lisina, leucina, treonina e cistina. Apresenta uma alta afinidade para ligar-se ao cálcio e a outros íons de metais bivalentes, inclusive Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} e Al^{2+} e, ainda, funciona como co-fator na síntese de lactose no tecido mamário. (WONG, 1996; MARKUS, 2002).

- Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são proteínas com alto peso molecular e perfazem com 10 a 15% no isolado de proteínas do soro. As principais classes presentes no leite são: IgA, IgD,

IgE, IgG e IgM. Dentre estas a IgG, principal imunoglobulina, tem a função na imunidade passiva e na atividade antioxidante (LONNERDAL, 2003).

- Albuminas

As albuminas bovinas representam de 5 a 10% das proteínas do soro do leite. É um peptídeo rico em cistina, portanto, precursor da síntese de glutathione. Além disso, são carreadoras de ácidos graxos na corrente sanguínea. (KINSELA, 1989, WIT, 1998).

- Lactoferrina

A lactoferrina é uma glicoproteína capaz de ligar, transportar ferro e promover sua absorção, correspondendo a cerca de 1 a 2% das proteínas do soro. Esta proteína ainda possui outra característica, a de efeitos antioxidantes. Ela apresenta forte atividade antimicrobiana em cultura de células, pois priva a bactéria de ferro e, em combinação com lisozimas, atua também contra vírus. (ROY et al., 2002).

- Enzimas

O soro do leite contém inúmeras enzimas, dentre elas: hidrolases, transferases, liases, proteases e lipases, mas a mais abundante é a lactoperoxidase, que corresponde com cerca de 0,5%. Esta última, além de degradar o peróxido de hidrogênio, exerce atividade antibacteriana (BJORCK, 1978; KUSSENGRAGERK, 2000).

- Glicomacropeptídeo

A glicomacropeptídeo é um peptídeo derivado da digestão da caseína-kapa, pela ação da quimosina durante a coagulação do queijo. Corresponde de 10 a 15% da proteína do soro, mas só está presente, quando é usada quimosina no processamento. Possui elevado teor de aminoácidos ramificados e carência em aminoácidos aromáticos como: fenilalanina, triptofano e tirosina, portanto, um alimento seguro para portadores de fenilcetonúria (BJORCK, 1978).

As outras sub-frações ou peptídeos secundários correspondem em pequenas concentrações no leite. Do ponto de vista nutricional, as proteínas do leite apresentam um Quociente de Eficiência Protéica (PER) elevado (MARSHALL, 2004).

1.11 Grau de Hidrólise

As proteínas podem ser modificadas intencionalmente por reações químicas, por reações catalisadas por enzimas, por transformações físicas ou por alterações genéticas. Essas modificações podem ocorrer *in vivo* ou *in vitro* (GONZÁLES –TELLO et al., 1994; SGARBIERI, 1996; IMAFIDON et al, 1997).

O grau de hidrólise é definido como o número de ligações peptídicas hidrolisadas em relação ao número total de ligações peptídicas de uma determinada proteína. O grau de hidrólise depende das condições do processo (relação enzima/substrato, tempo, temperatura e pH) e influenciado pela natureza da atividade enzimática (PANYAM, 1996).

Os hidrolisados podem ser classificados de acordo com o grau de hidrólise e com a aplicação dos mesmos. Assim, agrupam-se em três blocos: 1) baixo grau de hidrólise, entre

1 e 10%, com a finalidade de melhorar as propriedades funcionais, 2) grau de hidrólise variado, geralmente aqueles com alto grau de hidrólise, as quais são utilizados como aromatizantes e 3) com grau de hidrólise superior a 10%, para uso em alimentos e fins especiais (VIOQUE et al, 2001).

1.12 Utilização do Soro do Leite

Os hidrolisados protéicos são utilizados desde 1940. Dentre suas aplicações destacam-se: mistura para preparação de dieta enteral, com o objetivo de manter ou melhorar o estado nutricional; suplementos para praticantes de atividade física; dietas para idosos e para redução de peso (CLEMENTE, 2000). Contudo, o valor nutricional dos hidrolisados deve-se permanecer próximo da proteína de origem e apresentar algumas características, como: ser osmoticamente equilibrado, ser hipoalergênico e apresentar sabor aceitável (GANZÁLES-TELLO et al., 1994).

As proteínas são responsáveis pelo desenvolvimento dos músculos e também são fontes indispensáveis para quase todas as funções do corpo humano. As proteínas do soro fornecem alta qualidade protéica com um baixo teor de gordura e lactose. Portanto, agora é fácil compreender, porque as proteínas do soro são especialmente indicadas para formulação de dietas. Tais proteínas do soro podem ser encontradas na indústria em três formas: concentrado protéico, isolado protéico e hidrolisado protéico (JAYAPRAKASHA e BRUECKNER, 1999).

No Brasil, a produção de bebidas lácteas é uma das principais opções de aproveitamento do soro do leite, sendo as bebidas fermentadas as mais comercializadas. As

bebidas lácteas apresentam características sensoriais semelhantes ao iogurte e às bebidas lácteas não fermentadas. Contudo, o aproveitamento desse subproduto atinge apenas 15% do total de soro produzido tendo, em 2002, sua produção nacional estimada de 470 mil de toneladas (NEVES, 2001; NAKAMAE, 2004).

1.13 Digestão do Leite

No processo digestivo, após a ingestão do leite, detecta-se considerável quantidade de proteínas do soro no jejuno e apenas traços de caseínas intactas. A diferença no tempo de esvaziamento gástrico entre proteínas do soro do leite e da caseína se deve à solubilidade da primeira e à coagulação da caseína. O coágulo formado no meio ácido estomacal demora mais para ser liberado para o duodeno, enquanto a proteína do soro passa mais rapidamente e, conseqüentemente, mais rapidamente absorvida, logo, o soro recebe a denominação de proteína “rápida” (BOIRIE et al., 1997).

1.14 Aminoácidos de Cadeia Ramificada

Durante atividade física moderada, o consumo muscular de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), de aspartato e de asparagina aumentam. Os aminoácidos de cadeia ramificada atuam no ciclo da alanina-glicose, como substratos para produção de glicose, enquanto que a asparagina e o aspartato atuam como precursores de oxaloacetato no ciclo de Krebs. Esses aminoácidos modulam as respostas metabólicas dos carboidratos, pois aumentam o conteúdo de glicogênios muscular, reduzem o transporte de

glicose para o interior da célula muscular e mantém a atividade do ciclo de Krebs, a partir da síntese direta de oxaloacetato. (LANCHA, 1995).

1.15 Glutamina

A glutamina é um aminoácido condicionalmente indispensável, por ser o mais abundante aminoácido no corpo, participa de 40 a 60% do pool de aminoácidos livres no plasma (SMITH, 1990). Sua síntese acontece com base na necessidade corporal, ocorrendo, primeiramente, no tecido muscular, nos pulmões, no fígado e no cérebro. Este aminoácido desempenha papel importante no metabolismo protéico e no transporte de nitrogênio entre diversos órgãos. Além disso, age como nutriente nas células de divisão rápida, sendo os enterócitos os principais consumidores (WINDMUELLER e SPAETH, 1978).

A glutamina tem sido utilizada para melhorar a defesa imunológica de atletas (CASTELL e NEWSHOLME, 1997) e para indivíduos que apresentam alguma disfunção intestinal. Dentre suas funções, destacam-se: 1) manutenção do sistema imunológico (O'RIORDAIN et al., 1996); 2) equilíbrio do balanço ácido/básico durante estado de acidose; 3) desintoxicação corporal do nitrogênio e da amônia (SMITH e WILMORE, 1990); 4) combate à síndrome do *overtraining* (ROWBOTTOM et al., 1996); 5) fornecimento de nitrogênio para a síntese de nucleotídeos (NEWSHOLME e CARRIE, 1994).

1.16 Glutathione

Sabe-se que a glutathione é um potente agente antioxidante e depende das concentrações intracelulares de cisteína para ser sintetizada. A resistência de muitas células contra o estresse oxidativo está associada a elevados níveis intracelulares de glutathione em sua forma reduzida. Estudos sugerem que o estresse oxidativo, produzido durante a atividade física, contribui para o desenvolvimento da fadiga muscular, diminuindo o desempenho. (PEDERSEN, 2000).

Lands et al. (1999) administraram um suplemento à base de concentrado de proteína do soro do leite (20g / dia) a jovens adultos submetidos à teste em bicicletas por três meses. O mesmo foi comparado com o grupo controle que recebeu caseína. O grupo suplementado com o concentrado do soro do leite apresentou um aumento de 35,5% na concentração de glutathione. Além disso, este grupo conseguiu gerar mais potência e maior quantidade de trabalho em testes de velocidade, sugerindo melhor rendimento. Este achado estaria relacionado à alta concentração de cisteína presente nas proteínas do soro do leite. O aumento da concentração da glutathione também foi observado por Micke et al. (2001) e Moreno (2002), que suplementaram pacientes portadores do HIV com proteínas do soro lácteo.

1.17 Mecanismo de Adiposidade

Recentes estudos têm demonstrado que a alta concentração de cálcio presente no leite e em derivados favorecem a redução de gordura corporal. Este mecanismo fisiológico foi elucidado em adipócitos humanos e em modelos experimentais obesos por Zemel et al.

(2000) e Zemel (2003). O possível mecanismo prevê altas concentrações de cálcio, que reduziriam as concentrações dos hormônios calcitrópicos (1,25 dihidroxicolecalciferol – 1,25 (OH)₂D). Estes, quando em concentrações elevadas, estariam atuando em um fluxo de cálcio para dentro dos adipócitos. Tal mineral aumentaria a lipogênese (síntese de novo) e reduziria a lipólise. Ele seria a chave regulatória do metabolismo lipídico dos adipócitos. Assim, uma diminuição da concentração destes hormônios, mediada pela alta concentração de cálcio dietético, resultaria numa diminuição na deposição de gordura no tecido adiposo. O soro do leite teria vantagens neste mecanismo devido à alta concentração de cálcio de aproximadamente 600mg/100g.

1.18 Mecanismo de Saciedade

O conceito de proteína rápida e lenta foi introduzido por Borie et al., (1997). Estes autores compararam a diferença do processo de digestão e de absorção de duas fontes protéicas, caseína e proteína do soro do leite, e demonstraram que as concentrações pós-prandiais de aminoácidos no plasma foram mais rápidas com dieta contendo proteína do soro do leite do que com a caseína. Mas, já no início da década de 90, foi demonstrado que a caseína coagula no estômago, demorando mais para ser liberada, enquanto a proteína do soro do leite passa mais rapidamente e atinge altas concentrações de aminoácidos pós-prandial (BILLEAUD et al., 1990; MILLER et al., 1990). O estudo realizado por Hall et al., (2002), objetivou investigar o possível mecanismo de saciedade entre bebidas formuladas com fontes protéicas diferentes, caseína e proteína do soro do leite. Verificou-se que a bebida administrada 90 minutos antes da refeição, contendo proteína do soro do leite, foi

mais eficiente para proporcionar saciedade, redução do apetite e ingestão calórica, do que a bebida contendo caseína. A hipótese levantada para explicar tal mecanismo foi a de que altas concentrações pós-prandiais de aminoácidos no plasma, devido à saída mais rápida da proteína do soro do leite do estômago do que da caseína, induziram ao aumento do hormônio colecistoquinina (CCK) e do peptídeo glucagon (GLP-1), aumentando, assim, a saciedade. Pois, sabe-se que o hormônio CCK é estimulado pela entrada de proteína no duodeno (GO et al., 1970) e a secreção do GLP-1 se dá pelo esvaziamento gástrico (SCHIRRA et al., 1996). Estes foram previamente descritos por apresentarem importante papel na saciedade (BALLINGER e CLARK, 1994; LIEVERSE et al., 1994; GUTZWILLER et al., 1999).

1.19 Mecanismo de Anabolismo Muscular

A atividade física exerce várias mudanças fisiológicas, pois requer rápida mobilização de fontes metabólicas. A quebra das fontes energéticas acontece mediante a intensidade e a duração da atividade. Para exercícios de curta duração e intensidade elevada, a via metabólica predominante é anaeróbica, com consumo de glicose e produção de lactato. Para exercícios de longa duração e intensidade leve ou moderada, são utilizados, preferencialmente, pela via aeróbica, os ácidos graxos e aminoácidos. (HARGREAVES, 1995). O estado catabólico durante o exercício é compensado depois com a fase anabólica. Muitos pesquisadores demonstram os benefícios das proteínas e dos aminoácidos na habilidade de estimular no músculo a síntese protéica. Mas, para tal efeito, é preciso

considerar as doses e as composições destas proteínas assim como as misturas de aminoácidos.

A proteína do soro do leite possui um alto escore químico e uma alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) (ETZEL, 2004). Além disso, possui alta proporção de leucina, a qual estaria envolvida como chave inicial no sinal da via da síntese protéica muscular. A hipótese para tal mecanismo é o envolvimento da leucina no processo de fosforilação de proteínas que atuam na formação do complexo do fator de iniciação eucariótico 4F (eIF 4f), o qual inicia a tradução do RNAm para síntese global de proteínas. (ANTHONY et al., 2001). Além disso, a leucina atuaria no aumento da fosforilação da proteína ribossomal 56 quinase (70-kDa), a qual age na regulação da síntese protéica, no músculo esquelético, aumentando tanto a atividade como a síntese protéica para a tradução do RNAm.

Outro fator importante na composição do soro é sua composição aminoacídica, a qual é muito semelhante e proporcional à musculatura esquelética (HA e ZEMEL, 2003), favorecendo o anabolismo muscular. Segundo o estudo de Burke et al. (2001), durante seis semanas com suplementação de proteína do soro do leite (1,2 g/kg), em adultos jovens, submetidos a exercício de resistência, resultou em um significativo aumento da massa muscular, em comparação com um grupo que recebeu placebo.

1.20 Proteína e Desempenho Atlético

Existe um elo natural entre nutrição e fisiologia do exercício. A nutrição apropriada constitui um alicerce para o desempenho físico e proporciona o combustível para o trabalho

biológico. Além disso, os nutrientes dos alimentos fornecem os elementos indispensáveis para a síntese de novos tecidos e para o reparo das células existentes. Recentemente, o uso de aminoácidos e de proteínas tem sido difundido largamente entre os praticantes de atividade física e tornado objeto de estudo para vários pesquisadores.

Um dos pontos básicos na relação entre aminoácidos e rendimento esportivo surgiu quando Lemon e Proctor (1991) salientaram que pessoas praticantes de exercícios regularmente necessitavam de maior quantidade de proteína na dieta. Eles propuseram que indivíduos submetidos à atividade moderada tinham que ter um consumo protéico de 1,6 g/kg de peso corporal, já os submetidos à atividade física intensa, o consumo proposto foi de 1,2 g/kg de peso. Tais valores estão acima do recomendado pela *Recommended Dietary Allowance* (RDA) para pessoas sedentárias, mas a justificativa para tal recomendação foi devido à presença do estado catabólico gerado pelo exercício, assim como à resposta anabólica.

O trabalho elaborado por Pimenta et al. (2005) visou à medição do desempenho físico em função da dieta contendo duas fontes protéicas diferentes, isolado do soro do leite e outra com seu hidrolisado e atividade física, seguida de exaustão para alguns animais. Menores níveis de lactato sanguíneo e maiores níveis de albumina sérica no grupo alimentado com hidrolisado, resultaram em melhor desempenho físico. Além disso, os animais que foram treinados e depois levados à exaustão apresentaram maiores níveis de proteína sérica, em comparação com os animais sedentários.

Já em relação aos efeitos fisiológicos derivados do consumo das proteínas do soro do leite intactas, estudos têm confirmado que elas possuem propriedades superiores, inclusive às da própria caseína. Morifuji et al. (2005), por exemplo, observaram um

significante aumento no glicogênio muscular e hepático em ratos alimentados com proteína do soro do leite submetidos à natação durante duas semanas quando comparado com animais alimentados com caseína.

Em estudos recentes, demonstrou-se que a associação de carboidrato com proteína foi mais eficiente para recuperação do glicogênio muscular do que apenas a ingestão de carboidrato após atividade física (ZAWADZKI et al., 1992; IVY et al., 2002). A alimentação adequada, em termos de oferta de nutrientes, contribui para manutenção do peso corporal e para a adequada composição corporal, maximizando os resultados dos treinos e contribuindo para a manutenção da saúde.

1.21 Aplicações Terapêuticas

As proteínas do leite e do soro apresentam propriedades fisiológicas e funcionais diferentes que resultam na modulação de funções bioquímicas e fisiológicas, protegendo o organismo e podendo até retardar certos processos patológicos. Dentre estas funções, destacam-se: atividade antihipertensiva, atividade anticâncer, atividade imunomoduladora e proteção ao sistema cardiovascular.

Os autores Pins e Keenan (2006) estudaram o efeito do hidrolisado do soro do leite em comparação com o isolado (grupo controle) em pacientes em estágio 1 de hipertensão. Verificaram redução na pressão sanguínea sistólica e diastólica no grupo que consumiu o hidrolisado do soro do leite e, além disso, constataram uma diminuição significativa nos níveis de LDL colesterol e proteína C-reativa, no grupo estudado. A possível explicação para tal diminuição da pressão sanguínea seria do sistema renina-angiotensina, onde os

peptídeos do soro do leite inibiriam a enzima conversora de angiotensina I em angiotensina II (ECA). A regulação da pressão sanguínea é parcialmente regulada pelo sistema renina-angiotensina. A renina age sobre a angiotensina liberando, a angiotensina I, a qual é convertida em angiotensina II, um hormônio vasoconstritor, pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). A angiotensina II inativa a bradicinina (vasodilatador), aumentando a produção de aldosterona que, por sua vez, diminui a excreção renal e aumenta a retenção de líquido pelo organismo.

Estudos experimentais com animais demonstraram que o concentrado protéico do soro do leite apresenta atividade anticarcinogênica. O concentrado do soro induziu o aumento de glutathione nos tecidos e diminuiu o volume tumoral, devido, provavelmente, ao efeito estimulador da glutathione sobre a resposta imunológica. (BOUNOUS, 2000). Em outro estudo, foi observado que as proteínas do soro do leite ofereceram considerável proteção ao animal contra a indução de tumores, em relação às outras fontes protéicas analisadas, caseína e isolado protéico de soja (DIAS, 2004).

Moreno (2002) investigou o papel imunomodular do concentrado protéico do soro do leite em crianças portadoras do vírus HIV. Constatou-se que a suplementação nutricional com o soro rico em cisteína aumenta os níveis de glutathione nos eritrócitos e induz a melhora da relação entre os linfócitos T $CD4^+$ / $CD8^+$. O hemograma e a liberação de intermediários reativos de oxigênio mantiveram-se sem modificações. Além disso, não foram observados alterações nos marcadores de estresse oxidativo das crianças envolvidas no ensaio clínico. As crianças suplementadas apresentaram uma diminuição da ocorrência de episódios infecciosos.

O trabalho desenvolvido por Bartfay et al. (2003), no tratamento de doença crônica de sobrecarga de ferro na cardiomiopatia, demonstrou que os animais suplementados com proteína do soro do leite juntamente com ferro obtiveram menores concentrações de aldeídos citotóxicos, maiores níveis cardíacos de glutathione peroxidase (GPx) e de glutathione (GSH), em relação aos que receberam só ferro. Estes resultados sugerem proteção para o coração devido à diminuição de radicais livres.

1.22 Conclusão

O desenvolvimento de pesquisas a respeito do uso do soro do leite tem sido o motivo para a elucidação do impacto desta proteína para a saúde ou para os processos patológicos. Até a data de hoje, muitos benefícios foram constatados com a utilização de seus compostos biotivos. Este ganho não é só para a indústria de alimentos, mas para melhorias na saúde humana. Entre estes benefícios, destacam-se: atividade anticâncer, atividade imunomoduladora, proteção ao sistema cardiovascular, desempenho físico e entre outros. Novos estudos *in vitro* e *in vivo* ainda são necessários para analisar a real eficácia de seus componentes.

1.23 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADIBI, S.A. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transport (Pept-1) in health and disease. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.285, n.5, p.779-788, 2003.
2. ADIBI, S.A. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: Biology and function. **Gastroenterology**, v.113, p.332-340, 1997.
3. ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; KIMBAL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Signaling pathways involved in translation control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **The Journal of Nutrition**, v.131, n.3, p.856-860, 2001.
4. BALLINGER, A.B.; CLARK, M.L. L-phenylalanine releases cholecystokinin (CCK) and is associated with reduced food intake in humans: evidence for a physiological role of CCK in control of eating. **Metabolism**, v.43, n.6, p.735-738, 1994.
5. BARTFAY, W.J.; DAVIS, M.T.; MEDVES, J.M.; LUGOWSKI, S. Milk whey protein decreases oxygen free radical production in a murine model of chronic iron-overload cardiomyopathy. **The Canadian Journal of Cardiology**, v.19, n.10, p.1163-1168, 2003.
6. BILLEAUD, C.; GUILLET, J.; SANDLER, B. Gastric emptying in infants with or without gastro-oesophageal reflux according to type of milk. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.44, n.8, p.577-583, 1990.
7. BJORCK, L.A. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychotrophic bacteria in milk. **Journal of Dairy Research**, v.45, p.109-118, 1978.

8. BLANCO, A.; BRESSANI, R. Biodisponibilidad de aminoácidos in el frijol (*Phaseolus vulgaris*). **Archivos Latinoamericano de Nutrición**, v 41, n.1, p.38-51, 1990. CAPÍTULO 1
9. BORIE Y.; DANGIN, M.; GACHON, P.; VASSON, M.; MAUBOIS, J.; BEAUFRERE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.94, n.7, p.14930-14935, 1997.
10. BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, v.20, n.6c, p.4785-5792, 2000.
11. BURKE, D.G.; CHILIBECK, P.D.; DAVIDSON, K.S.; CANDOW, D.G.; FARTHING, J.; SMITH-PALMER, T. The effect of whey protein supplementation with and without creatine monohydrate combined with resistance training on lean tissue mass and muscle strength. **International Journal of Sport Nutrition and exercise Metabolism**, v.11, n.3, p.349-364, 2001.
12. CASTELL, L.M.; NEWSHOLME, E.A. The effect of oral glutamine supplementation on athletes after prolonged, exhaustive exercise. **Nutrition**, v.13, n.7-8, p.738-742, 1997
13. CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolyzates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, n.7, p.254-262, 2000.
14. DIAS, N.F.G.P.; SGARBIERI, V.C.; JACOBUCCI, H.B.; RANGEL, H.A.; TANIKAWA, C. Dietary protein, immune function and colon carcinogenesis in the mouse. **Dairy Science and Technology**, v.86, p.213-226, 2006.
15. ETZEL, M.R. Manufacture and use of dairy protein fractions. **The Journal of Nutrition**, v.134, n. 4, p.996-1002, 2004.

16. GO, V.L.W.; HOFMAN, A.F.; SUMMERSKILL, W.H.J. Pancreozymin bioassay in man based on pancreatic enzyme secretion: potency of specific amino acids and other digestive products. **Journal of Clinical Investigation**, v.49, p.1558-1564, 1970.
17. GONZÁLES –TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M.P.; GUADIX, E.M. Enzymatic hydrolysis of whey protein. II molecular weight range. **Biotechnology and Bioengineering**, v.44, n.4, p.529-532, 1994.
18. GUTSWILLER, J.P.; GOKE, B.; DREWE, J.; HILDEBRAND, P.; KETTERER, S.; HANDSCHIN, D.; WINTERHALDER, R.; CONEN, D.; BEGLINGER, C. Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. **Gut**, v.44, n.1, p.81-86, 1999.
19. HÁ, E; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.14, n.5, p.251-258, 2003.
20. HALL, W.L.; MILLWARD, D.J.; LONG, S.J.; MORGAN, L.M. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. **The British Journal of Nutrition**, v.89, n.2, p.293-248, 2003.
21. HARGRAVES, M. Skeletal muscle carbohydrate metabolism during exercise metabolism. In **Exercise Metabolism**. Hargreaves M. Human Kinetics Pub, Champaign, IL, p.41-72, 1995.
22. HEDSTROM, L. Trypsin a case study in the structural determinations of enzyme specificity. **Biological Chemistry**, v.377, n7-8, p.465-470, 1996.
23. HENLEY, E.C., KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. **Food Technology**, v.48, n.4, p.74-77, 1994.

24. IMAFIDON, G.I.; FARKYE, N.Y.; SPANIER, A.M. Isolation, purification, and alteration of some functional group of major milk protein: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.37, n.7, p.663-689, 1997.
25. IVY, J.L.; GOFORTH, H.W. Jr.; DAMON, B.M.; McCAULEY, T.R.; PARSONS, E.C.; PRICE, T.B. Early postexercise muscle glycogen recovery is enhanced with a carbohydrate-protein supplement. **Journal of Applied Physiology**, v.93, n. 4, p.1337-1344, 2002.
26. JAPAYAPRAKASHA, H.M.; BRUECKNER, H. Whey protein concentrate: a potential functional ingredient for food industry. **Journal Food Science and Technology**, v.36, n.3, p.189-204, 1999.
27. KIM, Y.S.; BIRTWHISTLE, W.; KIM, Y.W. Peptide hydrolases in the brush border and soluble fractions of small intestine mucosa of rat and man. **The Journal of Clinical Investigation**, v.51, n.6, p.1419-1430, 1972.
28. KINSELA, J.E., WHITEHEAD, D.M., Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.33, p.343-348, 1989.
29. KUSSENDRAGER, K.D.; VAN HOOIJDONK, A.C. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. **The British Journal of Nutrition**, v.84, p.19-25, 2000.
30. LANCHA Jr, A.H.; RECCO, M.B.; ABDALLA, D.S.P.; CURI, R. Effect of aspartate, asparagine and carnitin supplementation in the diet on metabolism of skeletal muscle during a moderate exercise. **Physiology and Behavior**, v.57, n.2, p.367-371, 1995.

31. LANDS, L.C.; GREY, V.L.; SMOUTAS, A.A. Effect of supplementation with cysteine donor on muscular performance. **Journal of Applied Physiology**, v.87, n.4, p.1381-1385, 1999.
32. LEMON, P.W.R.; PROCTOR, D.N. Protein intake and athletic performance. **Sports Medicine**, v.12, n.5, p.313-325, 1991.
33. LIEVERSE, R.J.; JANSEN, J.B.M.J.; MASCLÉE, A.A.M.; LAMERS, C.B.H.W. Satiety effects of cholecystokinin in humans. **Gastroenterology**, v.106, n.6, p.1451-1454, 1994.
34. LONNERDAL, B. Nutrition and physiologic significance of human milk proteins. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n.6, p.1537-1543, 2003.
35. MAKAMAE, I.J. **Anualper** 2004: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP, p.191-232, 2004.
36. MARKUS, C.R.; OLIVER, B.; DE HANN, E.H.F. Whey protein rich in alpha-lactoalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.75, n.6, p.1051-1056, 2002.
37. MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review**. v.9, n.2, p.136-156, 2004.
38. MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. Metabolismo de Aminoácidos. In: **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S.A., p.216-242, 1999.
39. MICKE, P.; BEEH, K.M.; SCHLAAK, J.F.; BUHL, R. Oral supplementation with whey proteins increases plasma glutathione levels of HIV-infected patients. **European Journal of Clinical Investigation**, v.31, n.2, p.171-178, 2001.

40. MILLER, M.J.S.; WITHERLY, S.A.; CLARK, D.A. Casein: Milk protein with diverse biologic consequences. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.195, n.2, p.143-159, 1990.
41. MORENO, Y.M.F. **Influência das proteínas do soro de leite bovino no estado nutricional, composição corporal e sistema imune em corte de crianças com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)**. Campinas, 2002. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP.
42. MORIFUJI, M.; SAKAI, K.; SANBONGI, C.; SUGIURA, K. Dietary whey protein increases liver and skeletal muscle glycogen levels in exercise-trained rats. **The British Journal of Nutrition**, v.32, p.493-445, 2005.
43. NELSON, D.L.; COX, M.M. A oxidação dos aminoácidos e a produção de uréia. In: **Lehninger princípios de bioquímica**, 3 ed. São Paulo, Sarvier, p.486-514, 2002.
44. NEVES, B.S. Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios. In: **Embrapa Gado de Leite**. Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar, p.97-108, 2001.
45. NEWSHOLME, E.A.; CARRIE, A.L. Quantitative aspects of glucose and glutamine by intestinal cell. **Gut**, v.35, p.13017, 1994.
46. O'RIORDAIN, M.G.; DE BEAUX, A.; FEARON, K.C. Effect of glutamine on immune function in the surgical patient. **Nutrition**, v.12, n.11, p.82-84, 1996.
47. OTTEN, J.J.; HELLWIG, J.P.; MEYERS, L.D. **Dietary DRI reference intakes: the essential guide to nutrient requirements**. Washington, D.C.: The national academies press, p.145-157, 2006.

48. PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.7, n.4, p.120-125, 1996.
49. PEDERSEN, B.K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. **Physiological Reviews**, v.80, n.3, p.1055-1081, 2000.
50. PIMENTA, F.M.V.; ABECIA-SORIA, M.I.; AULER, F., AMAYA-FARFÁN, J. Physical performance of exercise young rats fed hydrolyzed whey protein at a sub-optimal level. **International Dairy Journal**, v.16, p.984-991, 2006.
51. PINS, J.J.; KEENAN, J.M. Effects of whey peptides on cardiovascular disease risk factors. **Journal of Clinical Hypertension**, v.8, n.11, p.775-782, 2006.
52. POMPEIA, C. Glutaminase (E.C. 3.5.1.2. ou L-Glutamina amido-hidrolase). In: **Glutamina metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, p.17-63, 2000.
53. ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, M.A.; ANTONIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI, V.C. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. **Journal of Medicinal Food**, v.5, n.4, p.221-228, 2002.
54. ROWBOTTOM, D.G.; KEAST, D.; MORTON, A.R. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. **Sports Medicine**, v.21, n.2, p.80-97, 1996.

55. ROY, M.K.; KUWABARA, Y.; HARA, K.; WATANABE, Y.; TORNAI, Y. Peptides from the N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.9, p.2065-2074, 2002.
56. SALZANO, J.R. Nutrition supplements: practical applications in sports, human performance and life extension. **Symposium Series 007**; São Paulo, p.75-202, 1996/2002.
57. SCHIRRA, J.; KATSCHINSKI, M.; WELDMAN, C.; SCHAFFER, T.; WANK, U.; ARNOLD, R.; GOKE, B. Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans. **Journal of Clinical Investigation**, v.97, n.1, p.92-103, 1996.
58. SGARBIERI, V.C. Métodos de avaliação e qualidade nutricional dos alimentos. In: **Alimentação e Nutrição – Fator de Saúde e Desenvolvimento**. São Paulo, Almed, p.250-261, 1987.
59. SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: Propriedades, degradações, modificações. São Paulo, Varela, p.547, 1996.
60. SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do soro do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p.43-56, 2005.
61. SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Revista de Nutrição*, v.17, n.4, p.397-409, 2004.
62. SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Revisão alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, n.1.2, p.7-19, 1999.
63. SHANON, L.K.; CHATTERTON, D.; NIELSEN, K.; LONNERDAL, B. Glycomacropeptide and alfa-lactoalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutrition status in infant rhesus monkeys. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n.5, p.1261-1268, 2003.

64. SIAMAK, A.A. The oligopeptide transporter (PEPT-1) in human intestine: Biology and function. **Gastroenterology**, v.113, p.332-340, 1997.
65. SMITH, M.D. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.14, n.4, p.40-44, 1990.
66. SMITH, R.J.; WILMORE, D.W. Glutamine nutrition and requirements. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.14, p.94-99, 1990.
67. TSUJIMOTO, M. Membrane-bound aminopeptidase. **The Journal of Japanese Biochemical Society**, v.70, n.3, p.207-212, 1998.
68. VIOQUE, J.; CLEMENTE, A.; PEDROCHE, J.; YUST, M.M.; MILLÁN, F. Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos. **Grasas y Aceites**, v.52, n.2, p.132-136, 2001.
69. WALZEM, R.L.; DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Whey components: Millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.42, n.4, p.353-375, 2002
70. WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels in vivo for postabsorptive rat small intestine. **Journal of Biological Chemistry**, v.253, n.1, p.69-76, 1978.
71. WIT, J.N. Nutrition and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.3, p.597-608, 1998.
72. WHITCOMB, D.C.; LOWE, M.E. Human pancreatic digestive enzymes. **Digestive Diseases and Sciences**, v.52, n.1, p.1-17, 2007.
73. WONG, D.W.S., CAMIRAND, W.M., PAVLATH, A.E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.32, n.8, p.807-844, 1996.

74. ZAWADZKI, K.M., YASPELKIS, B.B.; IVY, J.L. Carbohydrate-protein complex increases the rate of muscle glycogen storage after exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.72, n.5, p.1854-1859, 1992.
75. ZEMEL, M.B. Mechanisms of dairy modulation of adiposity. **The Journal of Nutrition**, v.133, n.1, p.252-256, 2003.
76. ZEMEL, M.B.; SHI, H.; GREER, B.; DIRIENZO, D.; ZEMEL, P.C. Regulation of adiposity by dietary calcium. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.14, n.9, p.1132-1138, 2000.

CAPÍTULO 2

Capítulo 2

Efeito do consumo da proteína do soro do leite pré-hidrolisada e a atividade física de ratos na atividade catalítica de proteases intestinais

Ana Cláudia Coelho Nery Diez

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi examinar a influência da atividade física, com e sem exaustão, em ratos alimentados com proteínas do soro do leite, com e sem hidrólise prévia, na atividade enzimática das proteases intestinais em ratos treinados em esteira. No experimento foram utilizados 120 ratos machos, da raça Wistar, aleatoriamente divididos em 12 grupos, visando estudar as variáveis: dieta e treinamento físico. A formulação-base da dieta foi a AIN 93-G, modificada para conter 12% de proteína, sendo utilizados como fonte protéica o isolado do soro do leite, seu hidrolisado e a caseína (controle). Cada uma das três dietas resultantes foi dividida em quatro subgrupos, segundo o regime de atividade física: sedentários (SED), sedentários-exaustos (SEX), treinados (T) e treinados-exaustos (TEX), com protocolo de treinamento de quatro semanas. Os intestinos delgados foram coletados para análise da atividade enzimática da glutaminase,

leucina-aminopeptidase, quimotripsina e tripsina. Observou-se que a proteína hidrolisada promoveu diminuição da atividade da enzima glutaminase intestinal de 25 a 29%, em relação à atividade produzida pelas proteínas intactas (caseína e isolado). O treinamento, porém, teve como efeito aumentar a atividade da glutaminase entre 27 e 32% para cada uma das dietas, exceto para o hidrolisado. A exaustão, por outro lado, resultou em diminuição da atividade glutaminase intestinal para quase todas as dietas (média aproximada 30%). Na determinação das enzimas presentes no lúmen intestinal, a atividade das três proteases, leucina-aminopeptidase, quimotripsina e tripsina, foi mais alta na fração do jejuno, em comparação ao íleo. Foi observada uma aparente inibição enzimática da tripsina na fração jejunal pela presença de caseína, como tem sido relatado por alguns autores. Conclui-se que, tanto o estado físico-químico (hidrolisado ou não) da fonte protéica, quanto o treinamento físico têm influência na atividade da glutaminase intestinal, no sentido de a hidrólise prévia da proteína e a exaustão física, ambos produzirem diminuição da atividade enzimática da glutaminase. Tendo em conta que os animais que consumiram o hidrolisado tiveram excelente desempenho físico, o significado da diminuição da atividade enzimática não deve ser considerado como um resultado negativo, visto que a glutamina é alimento vital para o enterócito.

Palavras-Chave: Soro do leite; hidrolisado protéico; exaustão; proteases intestinais.

2.1 Introdução

O trato gastrintestinal desempenha papel fundamental na saúde humana, uma vez que o intestino delgado ganha destaque porque, além de ser o sistema de digestão e absorção de nutrientes, ele funciona como barreira de proteção para o organismo todo. Suas células, enterócitos, estão em intenso processo de divisão celular e, para manter a integridade do tecido, é preciso proporcionar uma adequada e constante oferta de nutrientes. A glutamina é o principal substrato energético de células de reprodução rápida, como os enterócitos, classificados como o principal órgão de utilização deste aminoácido (WINDMUELLER e SPAETH, 1974). Ele está envolvido como fornecedor de metade das exigências de nitrogênio para síntese de purinas e pirimidinas, via ação da carbamoil-fosfato sintetase II citosólica, sendo ainda precursor da síntese N-acetil-glicosamina e N-acetil-galactosamina, que podem exercer papéis importantes na síntese intestinal da mucina e, portanto, na manutenção da barreira passiva à invasão bacteriana (LOBLEY et al., 2002).

A captação da glutamina pelas células epiteliais faz-se a partir da luz intestinal e dos capilares, através da membrana baso-lateral (HORVATH et al., 1996). Seu metabolismo intracelular é regulado mediante duas enzimas principais: a glutaminase, localizada na membrana interna mitocondrial, que catalisa a hidrólise da glutamina para glutamato, e a glutamina sintetase, que catalisa a síntese de glutamina a partir de glutamato e do íon amônio.

O intestino delgado finaliza o processo de digestão mediante a ação de enzimas e co-adjuvantes produzidos por outros órgãos para facilitar a hidrólise dos alimentos. A digestão das proteínas por proteases as reduz até pequenos peptídeos e aminoácidos, já que

estas formas moleculares são facilmente assimiladas pelo organismo. As enzimas envolvidas no processo de digestão apresentam características de especificidade, como a quimotripsina e a tripsina, ambas, endopeptidases. Nesta fase a quimotripsina quebra as ligações peptídicas (lado carboxílico) dos resíduos aromáticos fenilalanina, triptofano e tirosina, enquanto a tripsina é muito mais específica e quebra apenas as ligações de resíduos (lado carboxílico) com cadeia lateral básica: lisina e arginina.

As proteínas que passam pelo trato gastrointestinal apresentam diferentes velocidades de absorção, fato observado por Borie et al. (1997), que demonstraram que as proteínas do soro do leite são digeridas e absorvidas mais rapidamente, em comparação com a caseína. A explicação para este fato foi relacionada à coagulação da caseína em pH ácido do estômago, resultando em maior tempo de esvaziamento gástrico, o que foi corroborado com a maior concentração pós-prandial de aminoácidos, após a ingestão da proteína do soro do leite em comparação com a caseína. Esta rápida absorção faz com que as concentrações plasmáticas de muitos aminoácidos atinjam altos níveis logo após a ingestão de proteínas do soro lácteo (DANGIN et al., 2001). Desta forma, e pelo maior conteúdo de leucina (ANTHONY et al., 2001), a ingestão das proteínas do soro de leite poderia explicar algumas das vantagens que ela possui para praticantes de atividade física, pois as proteínas do soro seriam substratos mais eficientes no desencadeamento do processo de síntese protéica. Além de aumentar as concentrações plasmáticas de aminoácidos, a ingestão das proteínas do soro aumentam, significativamente, a concentração de insulina plasmática (ZAWADZKI et al., 1992; CALBET et al., 2002), favorecendo, ainda mais, a captação de aminoácidos para o interior da célula muscular, otimizando a síntese e reduzindo o catabolismo protéico.

Já com relação aos efeitos fisiológicos derivados do consumo das proteínas do soro do leite, estudos têm confirmado que elas possuem propriedades superiores, inclusive às da própria caseína. Morifuji et al. (2005), por exemplo, observaram um significativo aumento no glicogênio muscular e hepático em ratos alimentados com proteína do soro do leite, submetidos à natação durante duas semanas, quando comparado com animais alimentados com caseína. Estes mesmos autores compararam o efeito de três proteínas, caseína, soja e soro de leite em ratos exercitados em esteira. Verificaram, portanto, aumento do glicogênio hepático nos animais alimentados com a proteína do soro de leite, concluindo que este resultado foi devido ao aumento das enzimas que regulam as vias glicolítica, gliconeogênica e aminotransferase (MORIFUJI, et al, 2005).

As mudanças que ocorrem pela atividade física têm sido apontadas por pesquisadores como promotoras do bem-estar à saúde, melhorando a aptidão funcional e contribuindo favoravelmente com os sistemas circulatório, respiratório, imunológico, entre outros. Com o intuito de atender à demanda energética imposta pelo exercício, mecanismos celulares, neurais e hormonais são ativados a fim de regular o metabolismo. Dentre estes fatores destacam-se os aumentos nas concentrações de determinados hormônios e a inibição de outros. A modificação na concentração de hormônios, principalmente o aumento do cortisol, também é capaz de aumentar a atividade da glutaminase no trato gastrintestinal (SARANTOS et al., 1994).

As proteínas do leite e do soro apresentam propriedades fisiológicas e funcionais diferentes que resultam na modulação ou melhoramento de funções bioquímicas e fisiológicas, protegendo o organismo e podendo até retardar certos processos patogênicos. Dentre estas funções destacam-se: atividade antihipertensiva (PINS e KEENAN, 2006),

atividade anticâncer (BOUNOUS, 2000) atividade imunomoduladora (DIAS et al., 2006), atividade antiúlcera (ROSANELI et al., 2002) e proteção ao sistema cardiovascular (BARTFAY et al., 2003). Verificado os benefícios da proteína do soro do leite no treinamento físico, o objetivo do presente estudo foi examinar a influência deste e do estado físico-químico da proteína da dieta, na atividade das proteases intestinais em ratos treinados em esteira.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material

Os reagentes NAD^+ , ADP, glutamato desidrogenase, n-benzoil-L-tirosina etil éster e a hemoglobina, foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, EUA). A glutamina foi da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). A L-leucinamida foi adquirida da Acrós Organics (New Jersey, EUA). O Tris buffer foi da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Os demais reagentes foram produtos analíticos de uso corrente adquiridos no comércio local.

2.2.2 Animais

Foram utilizados 120 ratos albinos machos da linhagem Wistar, recém-desmamados (21 dias), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas, SP, os quais permaneceram em condições ambientais controladas, com temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 50 a 60%, com ciclo alternado de claro e escuro de 12 horas e livre acesso à água.

2.2.3 Dietas

Os animais foram alimentados com dieta comercial (Nuvital, Curitiba, PR) por uma semana. Após este período de adaptação os animais foram alimentados com as dietas experimentais com a formulação da dieta AIN-93G (American Institute of Nutrition) (REEVES et al., 1993), com modificação do conteúdo de proteína bruta para 12% (PELLET, e YOUNG, 1980). As fontes protéicas utilizadas foram: o isolado do soro do

leite (ALACENTM 985) e seu hidrolisado (ALACENTM 817) com grau de hidrólise de 11%, determinado pelo método TNBS (ADLER-NISSEN, 1979) e a caseína como controle, ambos produzidos pela New Zealand Milk

Products. Os ratos foram divididos aleatoriamente em grupos (n=10) de acordo com o esquema da Figura 2.1.

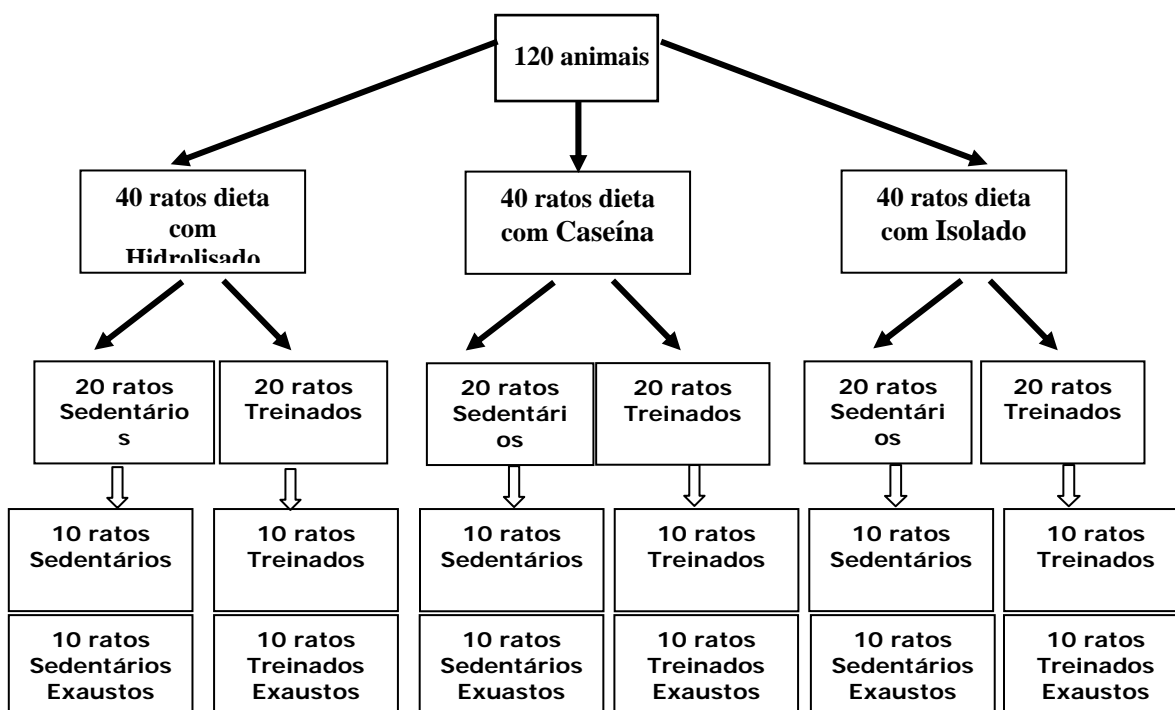


Figura 2.1. Esquema da distribuição dos ratos no experimento.

Tabela 2.1. Composição centesimal das dietas experimentais (base úmida).

Dietas	kcal /100g	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Carboidrato (%)	Umidade (%)	Cinzas (%)	Fibras (%)
Caseína	382,82 ^b (±1,71)	12,67 ^a (± 0,16)	8,02 ^c (± 0,07)	64,98 ^a (± 0,42)	8,98 ^a (± 0,40)	2,63 ^b (± 0,02)	2,72 ^b (± 0,07)
Isolado	390,73 ^a (±0,40)	12,62 ^a (± 0,12)	8,51 ^b (± 0,01)	65,66 ^a (± 0,19)	7,67 ^b (± 0,06)	2,57 ^b (± 0,01)	2,97 ^a (± 0,1)
Hidrolisado	389,71 ^a (±1,43)	12,88 ^a (± 0,38)	8,81 ^a (± 0,25)	64,98 ^a (± 0,29)	7,60 ^b (± 0,15)	2,89 ^a (± 0,06)	2,84 ^{ab} (± 0,05)

Os resultados estão expressos em médias ± DP; Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa, pelo teste de Tukey $p < 0,05$

Foi determinada a composição centesimal das dietas: proteína bruta, lipídeos cinza e fibras bruta (A.O.A.C., 1997) e umidade (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

2.3.4 Protocolo de Treinamento e Exaustão

Após duas semanas de adaptação, os animais seguiram um protocolo de treinamento, adaptado conforme descrito por Smoslka et al. (2000). Primeiramente, passaram por um teste de aptidão física de 5 minutos, em velocidade de 10m/min, com o intuito de classificá-los em treináveis e não-treináveis, sendo os primeiros caracterizados por corrida voluntária. Já os animais que se recusaram a correr foram excluídos do projeto.

Em seguida, os animais passaram por seis dias de adaptação física, e três semanas de treinamento. O procedimento de treinamento e exaustão foi o mesmo utilizado por Pimenta et al. (2006). Grupos de cinco animais foram aleatoriamente levados para a esteira

e submetidos à exaustão física, na velocidade de 32,5 m/min. O ponto de exaustão foi definido como o tempo de corrida em que o animal permanecia em contato com o choque na extremidade da esteira. Após a exaustão os animais voltaram para suas gaiolas, com livre acesso à dieta e à água e, no dia seguinte, foram sacrificados. Os protocolos experimentais utilizados com os animais foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa/IB/Unicamp).

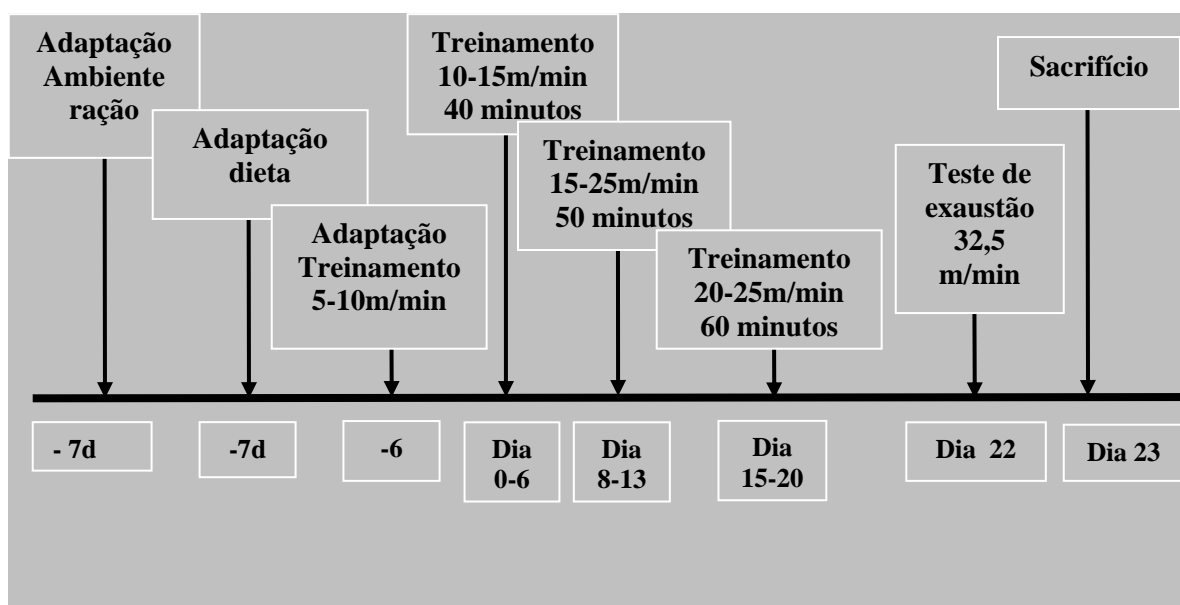


Figura 2.2. Esquema do protocolo de treinamento.

2.2.5 Preparação do Conteúdo Luminal da Fração Intestinal

Os animais foram decapitados e, em seguida, retirados os intestinos delgados. Para análise da glutaminase, o órgão foi lavado com um volume (~5mL) de solução tampão isotônica de fosfato (pH 7,4) no intestino delgado.

O órgão foi congelado em nitrogênio líquido, desintegrado em almofariz e armazenado no mesmo meio. Para análise da leucina-aminopeptidase, quimotripsina e tripsina, foram coletadas porções de 20cm para o jejuno e 20cm para o íleo (20cm acima da junção ileocecal). Seguidamente, foram introduzidos 5mL de tampão isotônico de fosfato (pH 7,4) e, após 5 minutos de extração. Uma segunda extração do conteúdo intestinal foi coletada e misturada com a primeira. Para remover qualquer turbidez o conteúdo foi centrifugado por 20 minutos a 15000xg a 4° C (OHTANI et al., 2003).

2.2.6 Determinação da Atividade Enzimática

Para examinar o efeito das três fontes protéicas na atividade enzimática da glutaminase no trato intestinal, foram utilizados substratos específicos para as proteases, todas as determinações foram realizadas no espectrofotômetro da Beckman Coulter (E.U.A.) modelo DU 640. Os ensaios da glutaminase foram conduzidos de acordo com método adaptado de Curthoys e Lowry (1973), e a dosagem do glutamato gerado por Bergmeyer (1971), a reação da glutaminase consistiu de tampão de extração 75mM K_2HPO_4 , 75mM KH_2PO_4 , 1mM EDTA, 50mM Tris aminometano, que foi homogeneizado com as amostras de tecido (100mg), depois foi centrifugado a 4° C a 12000xg. Ao sobrenadante (100μL) foi adicionado 100μL glutamina 20mM e 800μL tampão de ensaio de glutaminase, que consistiu de tampão de extração mais Triton 0,05% (pH 8,6), permanecendo a 37° C por 10 min. A reação foi interrompida com 200μL de TCA 25% e, centrifugada por 1 min a 12000xg a 4° C. Foi retirado 100μL do sobrenadante e acrescido 900μL de tampão de ensaio de glutamato, composto de 2mM NAD^+ , 3,25mM ADP, 0,333M glicina, 0,267M hidrato de hidrazina, 11,8U/mL glutamato desidrogenase. Em

paralelo com as amostras foram feitos três brancos: branco 1 que era igual as amostras, mas foi adicionado 200µL de TCA 25%, antes da incubação e, o branco 2 que continha os mesmos reagentes do procedimento da amostra, mas no lugar da amostra foi colocado 100µL de H₂O e depois foi seguido o mesmo procedimento. Para zerar o espectrofotômetro foi preparado um branco 3 com 900µL de tampão de ensaio de glutamato e 100µL de H₂O. O cromóforo foi determinado a 340nm.

A reação da leucina aminopeptidase foi conduzida de acordo com APPEL (1974), usou-se 500µL de amostra, 500µL cloreto de manganês (10nM) e 500µL de tampão Tris (0,2M, pH 8,0), pré-incubou-se por 15 min a 37° C e, depois foi colocado 1mL de L-leucinamida (10mM). Após este procedimento, foi retirado desta solução um volume de 500µL, e acrescentados mais 500µL de carbonato de potássio (30g de K₂CO₃ em 25mL de água destilada em ebulição) e adicionado 4mL da mistura de indicador composto primeiramente de um indicador elaborado com 2mg de bromocresol verde + 3mg de vermelho de metila e 5mL de etanol e, desta solução, foram retirados 2,5mL e misturados com 50mL de solução de ácido bórico (1,25g de ácido bórico diluído em 50mL de etanol) e incubou-se por duas horas, para depois titular-se com HCl 0,1N. Em paralelo, a solução restante com L-leucinamida ficou incubada por duas horas e depois foi retirado 500µL desta solução, a qual adicionaram-se 4mL da mistura e 500µL de carbonato de potássio e incubando-se por mais duas horas e, seguindo-se titulou-se com HCl 0,1N.

Para determinar a atividade da quimotripsina, as amostras foram processadas conforme descrito por RICK (1974), utilizando o espectrofotômetro. Amostras de 100µL foram adicionadas de 1,5mL tampão de Tris (80mM, 0,1mM CaCl₂, pH 7,8) e, como substrato para a reação, 1,4mL n-benzoil-L-tirosina etil éster (1,07mM). Foi preparado o

branco com os mesmos reagentes da amostra, mas esta foi substituída por 100µL de H₂O, a leitura a cada 30 segundos por 3 minutos, no comprimento de onda 256nm.

O ensaio da tripsina foi realizado conforme descrito por RICK (1974). Utilizou-se 1mL de amostra e 5mL de solução de substrato que consistiu de 2,0g de hemoglobina em 50mL de H₂O, 36g de uréia, 8mL de NaOH 1N, completou-se esta solução para 80mL, permanecendo em temperatura ambiente por 60 min. Depois, foram acrescentados 4,4mL de CaCl₂ a 5% e 10mL de ácido bórico (6,184g de ácido bórico e 0,292g NaCl, para 100mL). Incubou-se por 10 minutos e depois acrescentaram-se 10mL de TCA a 5%, permanecendo por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esta operação, a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 4000xg. No final, foi coletada uma alíquota de 5mL do centrifugado e adicionados 10mL de NaOH 0,5N e 3mL do reagente fenol (10g Na₂WO₄.2H₂O, 2,5g Na₂MoO₄.2H₂O, 15g Li₂SO₄, 5mL H₃PO₄ a 85% e 100mL HCl 1N) e centrifugou-se por 5 minutos a 4000xg, leu-se a absorbância em 641nm. Foi feito um branco em paralelo, no qual foi colocado um volume (10mL) de TCA a 5%, antes da incubação. Utilizou-se curva padrão de tirosina para avaliar a atividade enzimática, medida em espectrofotômetro.

2.2.7 Determinação de aminoácidos por cromatografia líquida

A análise aminoácídica (WHITE et al., 1986; HANGEN et al., 1989) das fontes protéicas usadas na elaboração das dietas intestinais foram hidrolisadas com ácido clorídrico 6N, durante 24 horas. Os aminoácidos liberados mediante hidrólise ácida foram tratados com fenilisotiocianato (PITC), separados por HPLC em fase reversa, detectados e quantificados por detector UV a 254nm. A quantificação foi feita por calibração interna

multinível, com auxílio do ácido alfa-aminobutírico (AAAB), como padrão interno.

2.3 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo programa SPSS, realizando-se o teste de variância multivariada (ANOVA) e a análise das diferenças entre médias segundo o teste de Tuckey, considerando como critério de significância $p < 0,05$.

2.4 Resultados e Discussão

O presente trabalho examinou a influência da dieta e da atividade física, com e sem exaustão, na atividade enzimática das proteases intestinais em ratos treinados em esteira. Os animais foram alimentados com fontes protéicas diferentes, caseína como grupo controle, isolado e seu proteolizado do soro do leite. Na Figura 2.3., estão dispostos os conteúdos dos aminoácidos indispensáveis e condicionalmente indispensáveis (OTTEN, J.J et al., 2006). Igual que na grande maioria das proteínas globulares, o glutamato encontra-se em altas concentrações nas três fontes protéicas. Era esperado que o hidrolisado não se diferenciasse do isolado no perfil de aminoácidos, porém, houve uma diferença pequena, embora significativa apenas em relação ao conteúdo da leucina. Esta diferença poderia ser resultado da perda deste aminoácido durante o fracionamento / processamento do hidrolisado, pois não foi possível detectar qualquer erro nas análises. Diferenças foram também observadas entre o perfil do isolado e do hidrolisado para os conteúdos de lisina e os aminoácidos sulfurados, as quais não foram possíveis interpretar.

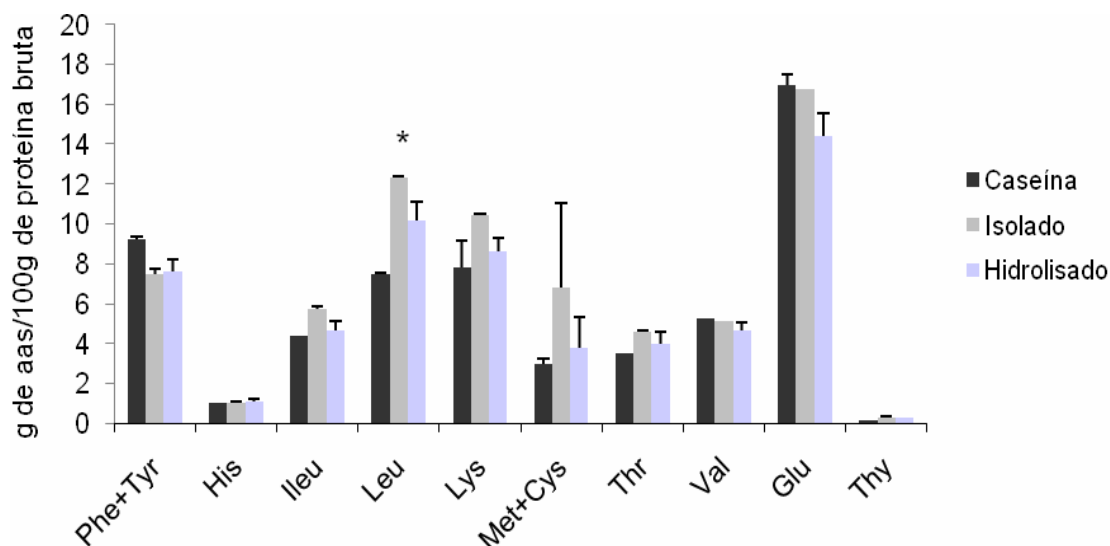


Figura 2.3. Comparação dos perfis de aminoácidos indispensáveis e condicionalmente indispensáveis das fontes protéicas utilizadas no experimento. Phe +Tyr; fenilalanina + tirosina; His, histidina; Ileu, isoleucina; Leu, leucina; Lys, lisina; Met + Ciy, metionina + cisteína; Thr, treonina; Val, valina; Glu, glutamato; Thy, triptofano. No gráfico, * representa a diferença significativa entre o aminoácido nas diferentes fontes protéicas, $p < 0,05$.

Para verificar a influência do estado das proteínas no desempenho físico dos animais, eles foram levados à exaustão física na esteira. Conforme Tabela 2.2., notou-se que não houve diferença significativa (ITEX X HTEX $p=0,387$, ISEX X HSEX $p=0,988$) entre as proteínas testadas, quando comparadas dentro do mesmo grupo. Em relação ao grupo controle que ingeriu caseína, houve aumento significativo no tempo de exaustão comparado com hidrolisado e o isolado. As diferenças do isolado e do hidrolisado para a caseína foram respectivamente de 205 e 163% no grupo dos treinados. Em relação ao grupo sedentário, o isolado e o hidrolisado também apresentaram tempos maiores de resistência, em comparação à caseína. Estes aumentos foram de 213% para isolado e 185% para hidrolisado. Ficou também evidente que os animais treinados tiveram desempenho

melhor do que os sedentários. A diferença do treinado exausto para o sedentário exausto foi de 178%, quando a dieta continha o isolado, 163% para aquelas elaboradas com o hidrolisado e 184% para os animais que consumiram caseína. Ainda em relação ao tempo de exaustão, foi observado que o treinamento permitiu desempenho melhor aos animais.

Pelos resultados observados, é provável que as proteínas em estudo, isolado e hidrolisado, tenham promovido alterações metabólicas semelhantes entre si, proporcionando utilização mais eficiente dos nutrientes, do que a caseína. Estes efeitos resultaram em melhor desempenho no treinamento e permanência por maior tempo no pico da atividade.

Tabela 2.2. Tempos de exaustão física para os três tipos de dieta, nos regimes de treinamento e sedentarismo.

Atividade Física	Treinados			Sedentários		
	Dieta	CTEX	ITEX	HTEX	CTEX	ITEX
Tempo (min.)	59 ^{bA} (±14)	96 ^{aA} (±43)	121 ^{aA} (±44)	32 ^{bB} (±9)	59 ^{aB} (±17)	68 ^{aB} (±13)

CTEX, caseína treinado-exausto; ITEX, isolado treinado-exausto; HTEX, hidrolisado treinado-exausto; CSEX, caseína sedentário-exausto; ISEX, isolado sedentário-exausto; HSEX, sedentário-exausto; Os resultados estão expressos em médias (\pm DP); Letras minúsculas comparam as dietas, dentro do mesmo nível de treinamento; Letras maiúsculas comparam os níveis de treinamento diferentes, dentro da mesma dieta. Teste de Tukey, $p < 0,05$.

Em 1998, Tassi et al. submeteram ratos à natação para verificar o efeito da proteína α -lactalbumina, em relação a seu hidrolisado enzimático e concluíram que o proteolizado melhorou o desempenho dos ratos exercitados. Mas, em outro experimento semelhante ao anterior, Ramos (2001) não encontrou que o hidrolisado tivesse vantagem, em comparação com a proteína intacta. A explicação para tal divergência foi o fato de que, enquanto no experimento de Tassi et al. (1998), a proteína tinha um grau de hidrólise médio (12%). No de Ramos (2001) utilizou-se proteína com alto grau de hidrólise (30%).

Pimenta et al. (2006) compararam o efeito metabólico do proteolizado do soro do leite com o isolado e observaram melhor benefício do hidrolisado do soro, em relação ao isolado (156 ± 18 e 60 ± 13 min), em ratos exercitados em esteira, seguido de exaustão física.

Na inexistência de outros trabalhos que comparem o efeito de proteínas intactas com seus hidrolisados no desempenho físico, resta mencionar que o estudo de Morifuji et al. (2005) compara as proteínas intactas do soro de leite com a caseína intacta com relação ao efeito do tipo de proteína da dieta e as reservas de glicogênio do organismo submetido ao exercício físico. Esses autores observaram um significativo aumento no glicogênio muscular e hepático em ratos alimentados com proteína do soro do leite submetidos à natação durante duas semanas, em comparação aos animais alimentados com caseína.

Além de analisar o efeito das proteínas da dieta na atividade física, o presente trabalho analisou a possibilidade de as fontes protéicas, em combinação com a atividade física, poderia resultar em alterações enzimáticas intestinais. Para tanto, foram avaliadas algumas proteases intestinais. No ensaio da glutaminase (Figura 2.4) observou-se que o consumo da proteína hidrolisada do soro lácteo promoveu a diminuição da atividade da glutaminase intestinal, entre 25 e 29%, em relação à atividade obtida com as proteínas

intactas (caseína e isolado; média observada para o hidrolisado em todos os grupos de atividade). O simples treinamento, por sua vez, teve como efeito um aumento na atividade enzimática de 27 a 32% nos animais alimentados com as proteínas intactas (caseína e isolado do soro do leite). A exaustão física, porém, resultou em diminuição da atividade da glutaminase intestinal para quase todas as dietas em aproximadamente 30%, com exceção do hidrolisado, que não mostrou diferença significativa ao ser administrado aos animais sedentários ($p=0,204$).

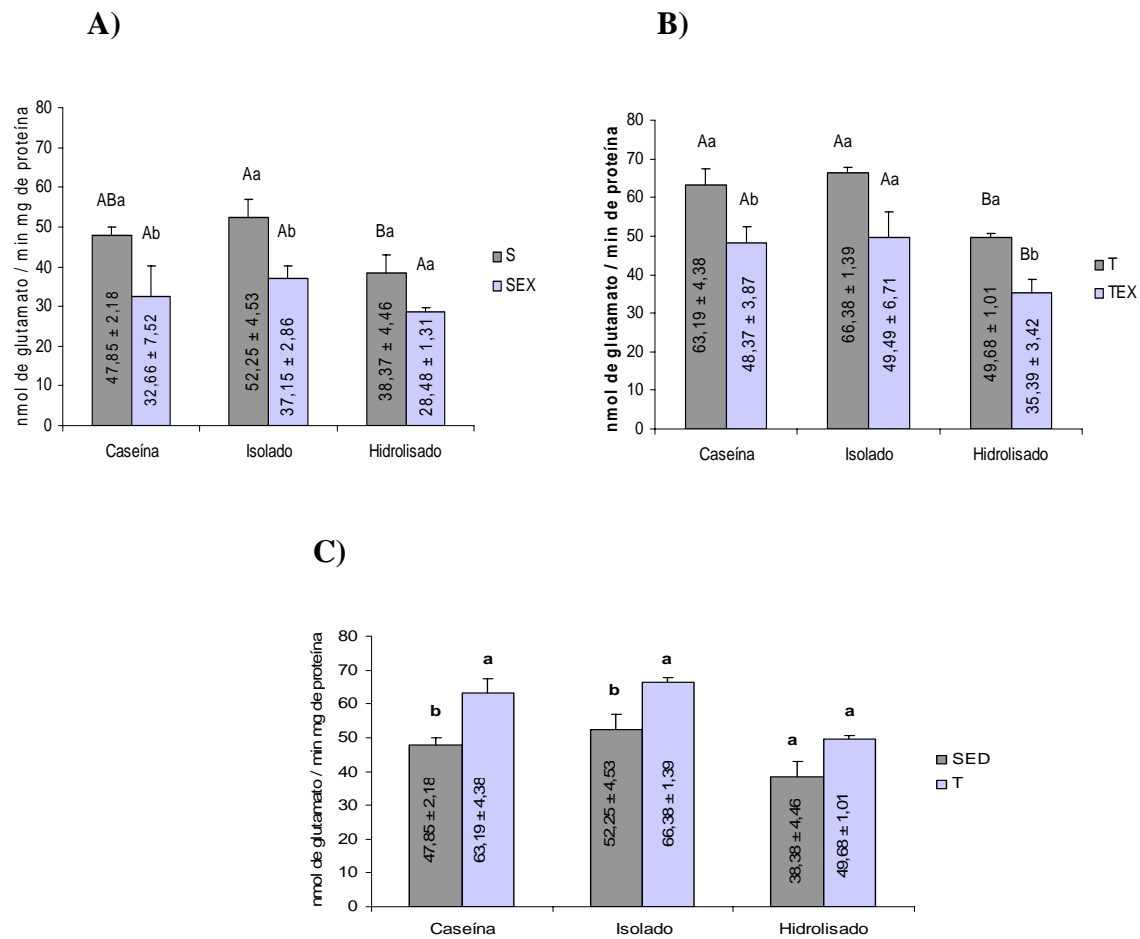


Figura 2.4 Efeito das proteínas presentes na dieta e da atividade física na atividade da glutaminase intestinal. A) Atividade da glutaminase intestinal nos grupos sedentários e sedentários exaustos; B) Atividade da glutaminase intestinal nos grupos treinados e treinados exaustos; C) Atividade da glutaminase intestinal nos grupos sedentários e treinados; SED, sedentário; SEX, sedentário exausto; T, treinado; TEX, treinado exausto; Os resultados estão expressos em média e mais ou menos o desvio padrão; Nos gráficos, letras minúsculas comparam médias entre níveis diferentes de atividade física, dentro das mesmas dietas. Letras maiúsculas comparam médias entre dietas, no mesmo grupo de atividade física (Tukey, $p < 0,05$).

Alterações na atividade da glutaminase podem ser explicadas na literatura em função de modificações nos níveis dos glicocorticóides, do glucagon, composição da dieta e por diferentes outros compostos. Estes últimos foram estudados na década de 70, por Pinkus e Windmueller (1977), demonstrando que a glutaminase é ativada pelos íons fosfato, amônio, sulfato, malato, bicarbonato, citrato, pirofosfato e oxalato, além da glicose-6-

fosfato. Masola e Zvinavashe, em 2003, verificaram aumento na atividade da glutaminase de enterócitos na presença de íons bicarbonato, o qual representa uma ativação fisiologicamente importante, uma vez que grande quantidade deste íon é liberada pelo pâncreas para neutralizar o conteúdo ácido do estômago, na sua chegada ao duodeno.

Os glicocorticóides são capazes de produzir alteração na atividade da glutaminase intestinal, visto que os níveis deste hormônio no organismo sofrem alterações mediadas pela atividade física. Trabalho com atletas masculinos, participantes de maratona, constatou aumento do nível de cortisol sanguíneo logo após a prova (de $20,3 \pm 2$, antes da prova, para $42,5 \pm 12,8$ $\mu\text{g/dl}$) (FRANÇA et al., 2003). Este aumento foi visto também por Acevedo et al. (2007) e Minetto et al. (2007), com corredores masculinos, que avaliaram as alterações hormonais entre atletas, em comparação ao grupo controle (sedentários) e observaram respostas de elevação do cortisol no grupo de atletas.

Adicionalmente, os glicocorticóides participam da regulação do metabolismo da glutamina (SOUBA et al., 1985; SOUBA et al. 1990), uma vez que esse aminoácido constitui a principal fonte energética dos enterócitos. Estudo realizado em 1988 já demonstrava que ratos tratados com glicocorticóides tiveram um aumento de 36% da atividade da glutaminase, com diminuição da utilização de glicose e um aumento do consumo de glutamina pelas células do intestino (SALLEH et al., 1988). Segundo Muhlbacher et al. (1984), a administração de glicocorticóides aumenta em quatro vezes a liberação de glutamina no organismo. Altas concentrações de glutamina na corrente sanguínea, ocasionadas pelo estresse, resultaram em aumento da captação de glutamina pelo intestino. Este processo evidenciou também diminuição da captação de glicose pelo mesmo (SOUBA et al., 1990).

É pertinente mencionar que no presente experimento, além da presença dos fatores já mencionados, existe ainda alta probabilidade de que tenha havido aumento do cortisol como resultado do estresse proveniente do estímulo elétrico na extremidade da raia de corrida. Este fator, entretanto, deveria ser anulado, uma vez que todos os animais, de todos os grupos, foram expostos ao mesmo estímulo.

A expressão gênica e a atividade da glutaminase dependem da ingestão de certos alimentos, principalmente os alimentos ricos em proteínas. Tal fato é evidenciado por estudos que verificam a influência de alguns aminoácidos na atividade da glutaminase intestinal. O trabalho de Kong et al. (2000) avaliou o enriquecimento da dieta parenteral com glutamina na atividade da glutaminase em ratos, resultando em aumento na atividade e na expressão da glutaminase nos enterócitos do jejuno e do íleo, em ratos catabólicos. Os resultados sugeriram que a fonte de glutamina promoveu um acúmulo do mRNA da glutaminase dentro do intestino e aumentou, desse modo, a atividade intestinal da glutaminase. Um trabalho semelhante ao anterior é o de McMauley et al., em 1999, mas com enriquecimento da dieta enteral com aminoácidos de cadeia ramificada, que resultou em aumento da atividade enzimática da glutaminase intestinal.

Na determinação das atividades das três proteases, leucina-aminopeptidase, quimotripsina e tripsina, foi encontrado no presente estudo que as três registraram atividades mais altas na porção do jejuno intestinal do que no íleo (Tabela 2.3), como era de se esperar. Observou-se também que a dieta teve influência nos dois segmentos intestinais, no sentido de que a caseína induzia menores níveis de atividade das três proteases. A dieta teve influência na fração do íleo para a leucina-aminopeptidase, apenas nos grupos

treinados e treinados-exaustos, o que foi considerado como um achado interessante, dada a possibilidade de que a atividade desta enzima seja estendida à região ilíaca em função da maior demanda provocada pelo exercício. Neste caso, a atividade da leucina-aminopeptidase do grupo caseína foi a menor, sendo que as atividades nos animais consumindo o isolado ou hidrolisado se mostraram semelhantes entre si. Já com relação a quimotripsina, constatou-se a tendência de a dieta com isolado resultar em maior atividade, do que nas dietas com o hidrolisado ou a caseína, como resultado do treinamento. Deve ser esclarecido que a diferença entre hidrolisado e isolado passou a ser não significativa após a exaustão (Tabela 2.3).

Para a enzima tripsina (Tabela 2.3) não foram observadas diferenças na atividade nos animais que consumiram a dieta com caseína, entre os diferentes níveis de atividade física na porção jejunal. Ainda, em relação à enzima tripsina da porção ilíaca, foi evidenciada atividades mais baixas para a caseína, nos grupos sedentários e sedentários-exaustos, enquanto que na porção jejunal, os níveis mais baixos ficaram com os grupos treinados e treinados-exaustos.

Tabela 2.3. Atividade das proteases nas frações intestinais, jejuno e íleo de ratos alimentados com caseína, isolado e hidrolisado do soro do leite, em diferentes níveis de atividade física.

Fração Intestinal Proteases	Atividade de proteases (nmol/min)			
	SED	SEX	T	TEX
Leu C Jejuno	291,90±13,90 ^a	282,63±21,23 ^a	315,07±8,03 ^a	310,43±21,23 ^a
Leu C Íleo	92,67±8,03 ^b	101,93±12,26 ^b	101,93±12,23 ^{bB}	115,83±8,03 ^{bB}
Leu I Jejuno	296,53±28,94 ^a	268,73±21,23 ^a	356,77±8,03 ^a	333,60±13,90 ^a
Leu I Íleo	106,57±8,02 ^b	134,37±12,26 ^b	139,00±8,03 ^{bA}	162,17±8,03 ^{bA}
Leu H Jejuno	301,17±8,03 ^a	282,63±8,03 ^a	338,23±8,03 ^a	324,33±16,05 ^a
Leu H Íleo	115,83±8,03 ^b	106,57±8,03 ^b	115,83±8,03 ^{bA}	143,63±16,05 ^{bAB}
Qui C Jejuno	214,58±25,46 ^a	185,56±12,57 ^a	221,85±20,71 ^{aB}	210,44±7,83 ^{aB}
Qui C Íleo	49,76±5,39 ^b	47,69±1,80 ^b	52,87±8,23 ^b	25,92±10,92 ^b
Qui I Jejuno	236,36±6,22 ^a	198,00±1,80 ^a	414,67±3,59 ^{aA}	363,87±8,23 ^{aA}
Qui I Íleo	71,53±8,23 ^b	43,54±6,22 ^b	40,43±4,75 ^b	75,68±12,95 ^b
Qui H Jejuno	255,99±16,46 ^a	216,66±20,71 ^a	241,54±7,18 ^{aB}	240,51±6,47 ^{aAB}
Qui H Íleo	49,64±18,92 ^b	54,94±22,50 ^b	57,02±15,96 ^b	36,28±6,47 ^b
Trip C Jejuno	1955,64±81,29 ^a	1952,41±105,33 ^a	1989,97±58,71 ^{aB}	1970,66±71,17 ^{aB}
Trip C Íleo	1130±118,64 ^{bB}	1026,26±46,31 ^{bB}	1162,55±90,77 ^b	1151,82±33,08 ^b
Trip I Jejuno	2190,66±76,62 ^a	2292,61±21,11 ^a	2442,86±29,22 ^{aA}	2395,64±12,88 ^{aA}
Trip I Íleo	1428,55±48,11 ^{bA}	1352,51±18,58 ^{bA}	1430,85±16,20 ^b	1332,11±30,43 ^b
Trip H Jejuno	2220,71±29,03 ^a	2066,17±153,64 ^a	2416,67±22,21 ^{aA}	2295,83±31,71 ^{aA}
Trip H Íleo	1392,21±18,59 ^{bA}	1385,78±30,94 ^{bA}	1360,02±38,28 ^{bA}	1335,45±44,49 ^b

L = leucina-aminopeptidase; Qui= quimotripsina; Trip= tripsina; C= caseína; I= isolado; H= hidrolisado; SED = sedentário; SEX= sedentário-exausto; T= treinado; TEX= treinado-exausto; Os resultados estão expressos em médias ± DP; Letras minúsculas diferentes, dentro do mesmo grupo de atividade (coluna) e mesma dieta indicam diferença significativa entre jejuno e íleo; letras maiúsculas diferentes, dentro do mesmo grupo de atividade (coluna) e fração intestinal, indicam diferença significativa entre as dietas, pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. Para simplificação, ausência de letras indica ausência de diferenças.

Com relação ao nível de atividade física, a atividade catalítica da tripsina no jejuno não mostrou alteração nos animais que consumiram caseína. Esta “inalteração” é interpretada na literatura como uma inibição enzimática que a caseína ocasiona no lúmen intestinal (LINDBERG et al., 1982). Este efeito foi avaliado por Othani et al. (2003), demonstrando o poder de inibição das diferentes frações de caseína (α -caseína, β -caseína e κ -caseína), nas enzimas tripsina e quimotripsina no lúmen intestinal. O efeito maior da inibição foi provocado pelas caseínas α e β , principais componentes da caseína, que correspondem respectivamente a 52 e 33%.

Os autores Othani et al. (2003) chegaram à conclusão de que tal inibição foi de natureza competitiva. Nesse mesmo trabalho, foi constatado que a caseína não exerce efeito inibitório sobre a enzima leucina-aminopeptidase. Com base nesse relato, a menor atividade associada à dieta de caseína no íleo, vista neste estudo (Tabela 2.3), deveria ser interpretada como resultado da natureza diferente das proteínas, enquanto que aquela entre o isolado e o hidrolisado, em combinação com o treinamento, seja devida aos tipos de peptídeos produzidos a partir dos diversos tipos de digestão das proteínas do soro do leite.

Com relação à inibição pela caseína, existem trabalhos que não demonstram tal efeito sobre a tripsina. Na falta de estudos que demonstrem o efeito de fontes protéicas, diferindo-se apenas no aspecto físico-químico, resta mencionar o trabalho de Hara et al. 2000. De acordo com esses pesquisadores, dietas contendo 20 a 60% de aminoácidos que simulavam a caseína, em comparação com animais alimentados com 20 a 60% de caseína, resultaram em aumento da secreção de tripsinogênio e da atividade da tripsina luminal nos animais alimentados com dieta com 60% tanto de aminoácidos como caseína. Este

experimento demonstrou também que somente os animais alimentados com 60% de caseína tiveram aumento no RNAm para colecistocinina.

Um outro trabalho dos mesmos autores, com o mesmo delineamento experimental, mas, agora, analisando a quimotripsina, constatou aumento da atividade e da expressão RNAm da quimotripsina, quando os animais foram alimentados com 60% de aminoácidos e também com caseína (HASHIMOTO e HARA, 2003). Já em 2007, ZHAO et al. demonstraram que dietas contendo 17,5 e 14,4% de proteína resultaram em aumento significativo na atividade da tripsina, quimotripsina e amilase intestinal em patos.

Existem trabalhos que demonstram também o aumento da atividade enzimática da tripsina, assim, como o aumento da quantidade de tripsinogênio no pâncreas, em decorrência da dieta (GROSSMAN et al., 1942; GIORGI et al., 1985) e da ação do hormônio colecistocinina. (MORISSET et al., 1992).

2.5 Conclusão

O presente estudo corrobora mais uma vez a melhoria do desempenho físico dos animais proporcionado pelo treinamento, quando comparados a animais sedentários, fato já amplamente constatado na literatura. As proteínas do soro do leite, independente do seu estado físico-químico (isolado e seu hidrolisado), proporcionaram rendimento significativamente maior no desempenho físico do animal do que a caseína. Foi evidenciado ainda que, nas condições do experimento, a apresentação físico-química das proteínas do soro do leite não teve influência (ITEX X HTEX $p=0,387$, ISEX X HSEX $p=0,988$) no desempenho físico. Esta divergência dos resultados com aqueles obtidos anteriormente, mesmo considerando a expressiva diferença nos valores absolutos, pode ser devida à falta de animais geneticamente selecionados para este tipo de ensaio. A forma físico-química da proteína, porém, resultou em alteração da atividade da glutaminase intestinal, uma vez que, os animais consumidores da proteína hidrolisada mostraram diminuição na atividade da mesma. Outro fator que resultou em diminuição da atividade enzimática foi à exaustão física. Tal efeito foi observado em todos os animais, exceto para os animais sedentários que consumiram o hidrolisado. Em relação às enzimas presentes no lúmen intestinal, verificou-se maior atividade enzimática na fração do jejuno, em comparação ao íleo, e uma possível inibição da tripsina na fração do jejuno, atribuída à presença de caseína. Em alguns casos, o isolado aumentou as atividades enzimáticas, enquanto que para outros, a caseína diminui as atividades das proteases nas frações intestinais.

Foi observado também que a atividade da quimotripsina sofreu aumento devido ao treinamento (jejuno), mas tal fato não foi observado para a tripsina. Esta alteração é um achado interessante que pode estar ligado a respostas diferentes destas enzimas, pois as duas são de origem pancreática e apenas a quimotripsina respondeu a algum tipo de ativação provocada pelo isolado e não pelo hidrolisado.

Finalmente, outro achado foi o de que a leucina-aminopeptidase, enzima oriunda dos enterócitos, aumentou de atividade especificamente no íleo, como resultado do treinamento. Esta observação é interpretada como resposta específica do exercício, seja ele treinamento simples ou treinamento, seguido de exaustão, a uma adaptação do organismo à maior necessidade de ingestão e utilização protéica.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACEVEDO, E.O.; KRAEMER, R.R.; KAMIMORI, G.H.; DURAND, R.J.; JOHNSON, L.G.; CASTRACANE, V.D. Stress hormones, effort sense, and perceptions of stress during incremental exercise: an exploratory investigation. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.21, n.1, p.283-288, 2007.
2. ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27, n.6, p.1256-1262, 1979.
3. ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; KIMBAL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Signaling pathways involved in translation control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **The Journal Nutrition**, v.131, n.3, p.856-860, 2001.
4. APPEL, W. Peptidases. In: **Methods of enzymatic analysis**, 2nd ed , v.2, p.954-958, Academic Press, New York, 1974.
5. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**, 16th ed. AOAC International, Maryland, USA ,1997.
6. BARTFAY, W.J.; DAVIS, M.T.; MEDVES, J.M.; LUGOWSKI, S. Milk whey protein decreases oxygen free radical production in a murine model of chronic iron-overload cardiomyopathy. **The Canadian Journal of Cardiology**, v.19, n.10, p.1163-1168, 2003.
7. BERGEMEYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**, New York, v.4, p.1704-1708, 1971.

8. BOIRIE Y.; DANGIN, M.; GACHON, P.; VASSON, M.; MAUBOIS, J.; BEAUFRERE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.94, n.7, p.14930-14935, 1997.
9. BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, v.20, n.6, p.4785-5792, 2000.
10. CALBET, J.A.L.; MAcLEAN, D.A. Plasma glucagon and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n.8, p.2174-2182, 2002.
11. CURTHOYS, N.P., LOWRY, O.H. The distribution of glutaminase isoenzymes in the various structure of the nephron in normal, acidotic and alkalotic rat kidney. **The Journal Biological Chemistry**, v.248, n.1, p.162-168, 1973.
12. DANGIN, M.; BOIRIE, Y.; GARCIA-RODENAS, C.; GANCHON, P.; FAUQUANT, J.; CALLIER, P. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v.280, n.2, p.340-348, 2001.
13. DIAS, N.F.G.P.; SGARBIERI, V.C.; JACOBUCCI, H.B.; RANGEL, H.A.; TANIKAWA, C. Dietary protein, immune function and colon carcinogenesis in the mouse. **Dairy Science and Technology**, v.86, p.213-226, 2006.
14. FRANÇA, S.C.A.; NETO, T.L.B.; AGRESTA, M.C.; LOTUFO, R.F.M.; KATER, C.E. Resposta divergente da testosterona e do cortisol séricos em atletas masculinos após uma corrida de maratona. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.50, n.6, p.1082-1087, 2003.

15. GIORGI, D.; RENAUD, W.; BERNARD, J-P.; DAGORN, J.C. Regulation of proteolytic enzyme activities and mRNA concentrations in rat pancreas by food content. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.127, p.937-942, 1985.
16. GROSSMAN, M.I.; GREENGARD, H.; IVY, A.C. The effect of dietary composition on pancreatic enzymes. **The American Journal of Physiology**, v.138, p.676-682, 1942.
17. HANGEN, S.R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of amino-acids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n.6, p.912-916, 1989.
18. HARA, H.; HASHIMOTO, N.; AKATSUKA, N.; KASAI, T. Induction of pancreatic trypsin by dietary amino acids in rats: four trypsinogen isozymes and cholecystokinin messenger RNA. **The Journal of Nutrition and Biochemistry**, v.11, n.8, p.52-59, 2000.
19. HASHIMOTO, N., HARA, H. Dietary amino acids promote pancreatic protease synthesis at the translation stage in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n.10, p.3052-3057, 2003.
20. HORVATH, K.; JAMI, M.; HILL, I.D.; PAPADIMITRIOU, J.C.; MAGDER, L.S., CHANASONGCRAM, S. Isocaloric glutamine-free diet and the morphology and function of rats small intestine. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.20, n.2, p.128-134, 1996.
21. KONG, S.E.; HALL, J. C.; COOPER, D.; McCAULEY, R. D. Glutamine-enriched parenteral nutrition regulates the activity and expression of intestinal glutaminase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1475, n.1, p.67-75, 2000.
22. LINDBERG, T.; OHLSSON, K.; WESTROM, B. Protease inhibitors and their relation to protease activity in human milk. **Pediatric Research**, v.16, p.479-483, 1982.

23. LOBLEY, G.E.; HOSKIM, S.O.; McNeil, C.J. Glutamine in animal science and production. **Journal of Nutrition**, v.131, p.255S-2531S, 2002.
24. MASOLA, B.; ZVINAVASHE, E. Phosphate-dependent glutaminase in enterocyte mitochondria and its regulation by ammonium and other ions. **Amino Acids**, v.24, n.4, p.427-243, 2003.
25. McMAULEY, R.; KONG, S.E.; HELL, K.; HALL, J.C. The role of glutaminase in the small intestine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.31, p.405-413, 1999.
26. MINETTO, M.A.; LANFRANCO, F.; BALDI, M.; TERMINE, A.; KUIPERS, H.; GHIGO, E.; AINOLDI, A. Corticotroph axis sensitivity after exercise: comparison between elite athletes and sedentary subjects. **Journal of Endocrinological Investigation**, v.30, n.3, p.215-223, 2007.
27. MORIFUJI, M.; SAKAI, K.; SANBONGI, C.; SUGIURA, K. Dietary whey protein increases liver and skeletal muscle glycogen levels in exercise-trained rats. **British Journal of Nutrition**, v.32, p.493-445, 2005.
28. MORIFUJI, M.; SAKAI, K.; SUGIURA, K. Dietary whey protein modulates liver glycogen level and glycoregulatory enzyme activities in exercise-trained rats. **Experimental Biology and Medicine**, v.230, n.1, p.23-30, 2005.
29. MORISSET, J., GUAN, D., JURKOWSKA, G., RIVARD, N., GREEN, G.M. Endogenous cholecystokinin, the major factor responsible for dietary protein-induced pancreatic growth. **Pancreas**, v.7, p.522-529, 1992.

30. MUHLBACHER, F.; KAPADIA, C.R.; COLPOYS, M.F. et al. Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in skeletal muscle. **The American Journal of Physiology**, v.247, n.1, p.75-83, 1984.
31. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 2 ed, São Paulo, 1985.
32. OHTANI, S.; SHIRASU, K.; OGAWARA, K-I.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. Evaluation of inhibitory activity of casein on proteases in rat intestine. **Pharmaceutical Research**, v.20, n.4, p.611-617, 2003.
33. OTTEN, J.J.; HELLWIG, J.P.; MEYERS, L.D. Dietary DRI reference intakes: the essential guide to nutrient requirements. Washington, D.C.: The national academies press, p.145-157, 2006.
34. PELLET, P.L.; YOUNG, V.R. Nutrition evaluation of protein foods, Tokyo: The United Nations University, p.154, 1980.
35. PIMENTA, F.M.V., ANBECIA-SORIA, M.I., AULER, F., AMAYA-FARFÁN, J. Physical performance of exercise young rats fed hydrolyzed whey protein at a sub-optimal level. **International Dairy Journal**, v.16, p.984-991, 2006.
36. PINKUS, L.M.; WINDMUILLE, H.G. Phosphate-dependent glutaminase of small intestine and localization and role in intestinal glutamine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.182, p.506-517, 1977.
37. PINS, J.J.; KEENAN, J.M. Effects of whey peptides on cardiovascular disease risk factors. **Journal of Clinical Hypertension**, v.8, n.11, p.775-782, 2006.
38. RAMOS, A.G. **Utilização das proteínas do soro lácteo por ratos jovens**. Dissertação de mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, 83p, 2001.

39. REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. Jr. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.
40. RICK, W. Chymotrypsin. In: **Methods of enzymatic analysis**, 2nd ed, v.2, p.1006-1012, Academic Press, New York, 1974.
41. RICK, W. Trypsin. In: **Methods of enzymatic analysis**, 2nd ed, v.2, p.1013-1024, Academic Press, New York, 1974.
42. ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, M.A.; ANTONIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI, V.C. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. **Journal of Medicinal Food**, v.5, n.4, p.221-228, 2002.
43. SALLEH, M.; ARDAWI, M.; MAJZOUN, M.F.; NEWSHOLME, E.A. Effect of glucocorticoid treatment on glucose and glutamine metabolism by the small intestine of the rat. **Clinical Science**, v.75, n.1, p.93-100, 1988.
44. SARANTOS, P.; ABOUHAMZE, Z.; COPELAND, E.M.; SOUBA, W.W. Glucocorticoids regulate glutaminase gene expression in human intestinal epithelial cells. **Journal of Surgical Research**, v.57, n.1, p.227-231, 1994.
45. SMOLKA, M.B.; ZOPPI, C.C.; ALVES, A.A.; SILVEIRA, L.R.; MARANGONI, S.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; NOVELLO, J.C.; MACEDO, D.V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **The American Journal of Physiology –Regulatory, Integrative and Corporative Physiology**, v.279, p.1539-1545, 2000.

46. SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. *Analytical Chemistry*, v.39,n.12, p.1412-1415, 1967.
47. SOUBA, W.W.; KLIMBERG, V.S.; PLUMLEY, D.A. et al. The role of glutamine in maintaining a healthy gut and supporting the metabolic response to injury and infection. **The Journal of Surgical Research**, v.48, n.4, p.383-391, 1990.
48. SOUBA, W.W.; SMITH, R.J.; WILMORE, D.W. Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in visceral organs. **Metabolism**, v.34, n.5, p.450-456, 1985.
49. TASSI, E.M; AMAYA-FARFAN, J.; AZEVEDO, R. Hydrolyzed α -lactalbumina as a source of protein to the exercising. **Nutrition Research**, v.18, n.3, p.875-881, 1998.
50. WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. **The Journal Biological Chemistry**, v.249, n.16, p.5070-5079, 1974.
51. WHITE, J.A.; HART, R.J.; KRY, JC. An evaluation of the waters pico-tag system for the amino acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n.4, p.170-177, 1986.
52. ZAWADZKI, K.M.; YASPELKIS, B.B; IVY, J.L. Carbohydrate-protein complex increased the rate of muscle glycogen storage after exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, n.5, p.1854-1859, 1992.
53. ZHAO, F.; HOU, S.S.; ZHANG, H.F.; ZHANG, Z.Y. Effect of dietary metabolizable energy and crude protein content on the activities of digestive enzymes in jejunal fluid of peking ducks. **Poultry Science**, v.86, n.8, p.1690-1695, 2007.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3

**Absorção de produtos da hidrólise de proteínas no
intestino do rato exercitado**

Ana Cláudia Coelho Nery Diez

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi examinar o transporte de aminoácidos e de peptídeos *in vitro*, após infusão de soluções protéicas (isolado e hidrolisado do soro do leite) em intestinos de ratos sedentários e submetidos à atividade física. No experimento foram utilizados 80 ratos machos, da raça Wistar, divididos aleatoriamente em 8 grupos, visando estudar as variáveis: dieta e treinamento físico. A dieta foi formulada com base na AIN 93-G, modificada para conter 12% de proteína, sendo utilizados como fonte protéica o isolado do soro do leite e seu hidrolisado. Cada uma das duas dietas foi dividida em quatro subgrupos, segundo o regime de atividade física: sedentários (SED), sedentários-exaustos (SEX), treinados (T) e treinados-exaustos (TEX), com protocolo de treinamento de quatro semanas. Os intestinos foram extraídos, lavados e um dos seus extremos amarrado, e uma alíquota da solução ou suspensão protéica infundida no seu interior com seringa. A outra extremidade foi fechada, permanecendo incubada em solução fisiológica por duas horas, na temperatura de 37°C. Após, tal tratamento, as soluções obtidas do conteúdo interno e do meio externo foram filtradas e derivatizadas com fenilisotiocianato para análise cromatográfica dos perfis de aminoácidos e, separadamente, dos peptídeos remanescentes

no interior ou perfusados. Neste estudo, pode-se constatar que houve maior passagem de aminoácidos e peptídeos nos órgãos dos animais que foram infundidos com o hidrolisado. Em relação aos diferentes níveis de atividade física, os animais treinados, alimentados com ambas às dietas, isolado e seu proteolizado, tiveram maior passagem de aminoácidos.

Palavras-Chave: atividade física; soro do leite; intestino; absorção de aminoácidos

3.1 Introdução

O soro do leite é um subproduto resultante da fabricação do queijo por coagulação da caseína, obtido por adição de ácidos ou por enzimas (soro doce). Ele possui elevado valor nutricional, conferido pela presença de proteínas com alta concentração de aminoácidos indispensáveis, em especial os aminoácidos sulfurados. Os aminoácidos presentes no soro excedem quase todas as doses recomendadas para todas as idades, com exceção aos aminoácidos aromáticos, que estão presente nas concentrações recomendadas (SGARBIERI, 2004). O soro contribui com 20% de toda proteína do leite e, o restante corresponde à caseína. As frações que correspondem ao soro são: beta-lactoglobulina (50-55%), o maior peptídeo do soro (WIT, 1998); alfa-lactalbumina (20-25%) (SHANNON et al., 2003); imunoglobulinas (10-15%) (LONNERDAL, 2003); albuminas (5-10%) (KINSELA e WHITEHEAD, 1989); lactoferrina (1-2%) definida como uma glicoproteína (WALZEM, et al., 2002); inúmeras enzimas dentre elas: hidrolases, transferases, liases, proteases e lipases, mas a mais abundante a lactoperoxidase (0,5%) (BJORCK, 1978; KUSSENGRAGERK et al., 2000); glicomacropéptido, um peptídeo derivado da digestão da kapa-caseína (BJORCK, 1978), outras sub-frações ou peptídeos secundários, estes correspondendo a pequenas concentrações (MARSHALL, 2004).

As frações protéicas do leite agregam atributos nutricionais, funcionais e fisiológicos, as quais podem ser isoladas e utilizadas pela indústria farmacêutica e pela a de alimentos. A proteína do soro do leite é classificada como uma proteína de rápida digestão. Estudo de Boirie et al., em 1997, demonstrou que as concentrações pós-prandiais de aminoácidos no plasma foram mais rápidas com dieta contendo proteína do soro do leite do

que com a caseína. Mas, o fato pode ser explicado devido à coagulação da caseína no estômago, demorando mais para ser liberada, enquanto a proteína do soro do leite é liberada mais rapidamente, resultando, portanto, em altas concentrações de aminoácidos pós-prandiais (BILLEAUD et al., 1990; MILLER et al., 1990).

Devido a estas características, o soro ganha destaque para os praticantes de atividade física. Van Lonn et al. (2000), demonstraram que a ingestão de uma solução contendo as proteínas do soro e os carboidratos fizeram com que estas aumentassem as concentrações plasmáticas de sete aminoácidos indispensáveis, em comparação com a caseína. Tal resultado é importante, pois a leucina, um dos principais aminoácidos, poderia estar envolvida no processo de iniciação da síntese protéica. (ANTHONY et al., 2001). Além disso, Há e Zemel (2003) destacaram que o perfil de aminoácidos das proteínas do soro do leite é muito similar a proteínas do músculo esquelético.

A fim de que se tenha a disponibilização de aminoácidos para o organismo e para a atividade física, é preciso passar pelo trato gastrointestinal. Assim, o intestino delgado ganha destaque, pois sua função principal é finalizar o processo de digestão e absorver os nutrientes que já foram digeridos. Esta assimilação de nutrientes garante as exigências requeridas pelo nosso organismo. No século XIX, acreditou-se que as proteínas eram absorvidas somente quando estivessem na forma de aminoácidos livres. Passados muitos anos, verificou-se que a absorção não se dava somente na forma de aminoácidos livres e sim por dipeptídeos e tripeptídeos (ADIBI e MERCER, 1973). Estudos sugeriram um sistema de transporte, que foi validado recentemente após a clonagem do transportador intestinal de oligopeptídeos (LIANG et al., 1995).

Embora as proteínas do soro do leite possuam elevada digestibilidade e sejam rapidamente absorvidas para a circulação sanguínea, sabe-se que os hidrolisados protéicos, contendo peptídeos de pequeno tamanho, di e tripeptídeos, são absorvidos numa velocidade maior. Verificados os efeitos positivos do soro do leite, tanto no aspecto nutricional, digestivo e esportivo, foi de interesse nesta pesquisa investigar a passagem de suspensões protéicas do isolado do soro do leite e seu hidrolisado, a partir de infusões no intestino delgado de ratos exercitados. O estudo foi complementado com a monitoração do efeito metabólico das dietas e exercícios nos animais, durante as fases de crescimento e treinamento.

3.2 Material e Métodos

3.2.1. Material

O reagente, ácido α -aminobutírico, foi adquirido da Sigma-Aldrich Chemical (Steinheim, Alemanha). O fenilisotilcianato foi adquirido da Pierce. O ácido trifluoracético foi adquirido da Merck KGaA (Hohenbrunn, Alemanha). Os demais reagentes foram produtos analíticos de uso corrente adquiridos no comércio local.

3.2.2 Animais

Foram utilizados 80 ratos albinos machos da linhagem Wistar, recém-desmamados (21 dias), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas, SP, os quais permaneceram em condições ambientais controladas, com temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 50 a 60%, com ciclo alternado de claro e escuro de 12 horas e livre acesso à água.

3.2.3 Dietas e Balanço Nitrogenado

Os animais foram alimentados com dieta comercial (Nuvital, Curitiba, PR) por uma semana. Após este período de adaptação os animais foram alimentados com as dietas experimentais com base na AIN-93G (American Institute of Nutrition) (REEVES et al., 1993), com modificação do conteúdo de proteína bruta para 12% (PELLET, e YOUNG, 1980). As fontes protéicas utilizadas foram o isolado do soro do leite (ALACENTM 985) e seu hidrolisado (ALACENTM 817) com grau de hidrólise de 11%, determinado pelo método TNBS (ADLER-NISSEN, 1979), ambos produzidos pela New Zealand Milk

Products. Além disso, foi determinado o balanço nitrogenado, o qual consistiu na diferença do nitrogênio ingerido e o excretado. Para determinação do nitrogênio (A.O.A.C., 1990) foram coletadas as fezes e a urina dos três últimos dias com dieta experimental. Utilizou-se como fator de conversão para proteína o fator 6,38. Os ratos foram divididos aleatoriamente em grupos (n=10) de acordo com o esquema da Figura 3.1.

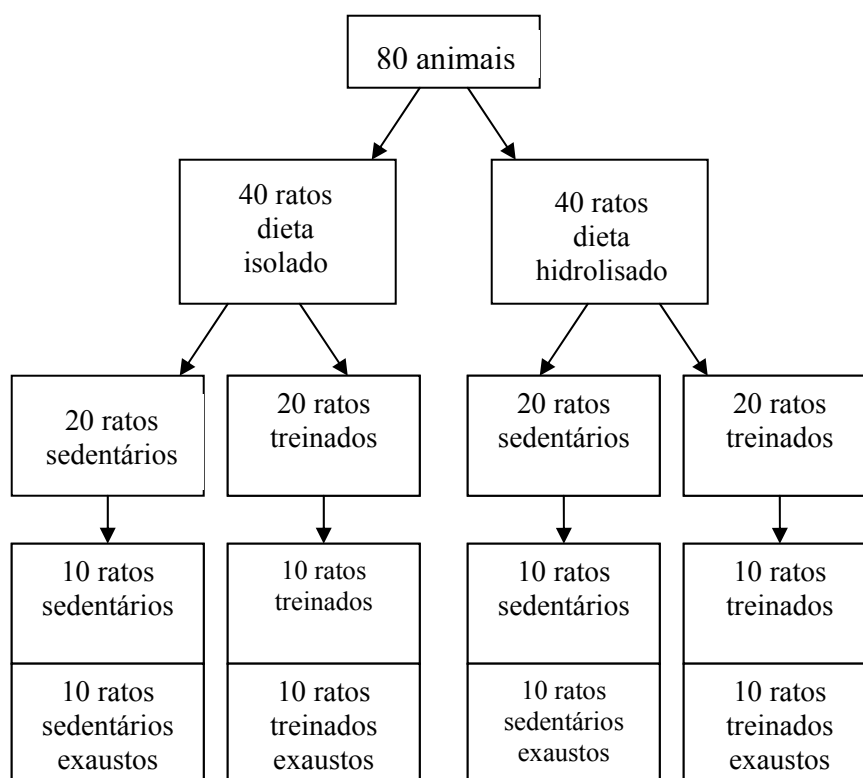


Figura 3.1. Esquema da distribuição dos ratos no experimento

Tabela 3.1. Composição centesimal das dietas experimentais (base úmida).

Dietas	kcal /100g	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Carboidrato (%)	Umidade (%)	Cinzas (%)	Fibras (%)
Isolado	390,73 ^a (±0,40)	12,62 ^a (± 0,12)	8,51 ^b (± 0,01)	65,66 ^a (±0,19)	7,67 ^a (± 0,06)	2,57 ^b (± 0,01)	2,97 ^a (± 0,1)
Hidrolisado	389,71 ^a (±1,43)	12,88 ^a (± 0,38)	8,81 ^a (± 0,25)	64,98 ^a (±0,29)	7,60 ^a (± 0,15)	2,89 ^a (± 0,06)	2,84 ^a (± 0,05)

Os resultados estão expressos em médias ± DP; Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa, pelo teste de Tukey $p < 0,05$

Foi determinada a composição centesimal das dietas: proteína bruta, lipídeos cinza e fibras bruta (A.O.A.C., 1997) e umidade (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

3.2.4 Protocolo de Treinamento e Exaustão

Após duas semanas de adaptação, os animais seguiram um protocolo de treinamento, adaptado conforme descrito por Smoslka et al. (2000). Primeiramente, passaram por um teste de aptidão física de 5 minutos, em velocidade de 10m/min, com o intuito de classificá-los em treináveis e não-treináveis, sendo os primeiros caracterizados por corrida voluntária. Já os animais que se recusaram a correr foram excluídos do projeto.

Em seguida, os animais foram submetidos a seis dias de adaptação física, e três semanas de treinamento. O procedimento de treinamento e exaustão foi o mesmo utilizado por Pimenta et al. (2006). Grupos de cinco animais foram aleatoriamente levados para a esteira e submetidos à exaustão física, na velocidade de 32,5 m/min. O ponto de exaustão foi definido como o tempo de corrida em que o animal não reagia ao choque na

extremidade da esteira. Após a exaustão os animais voltaram para suas gaiolas, com livre acesso à dieta e à água e, 24 horas mais tarde, foram sacrificados. Os protocolos experimentais utilizados com os animais foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA/IB/Unicamp).

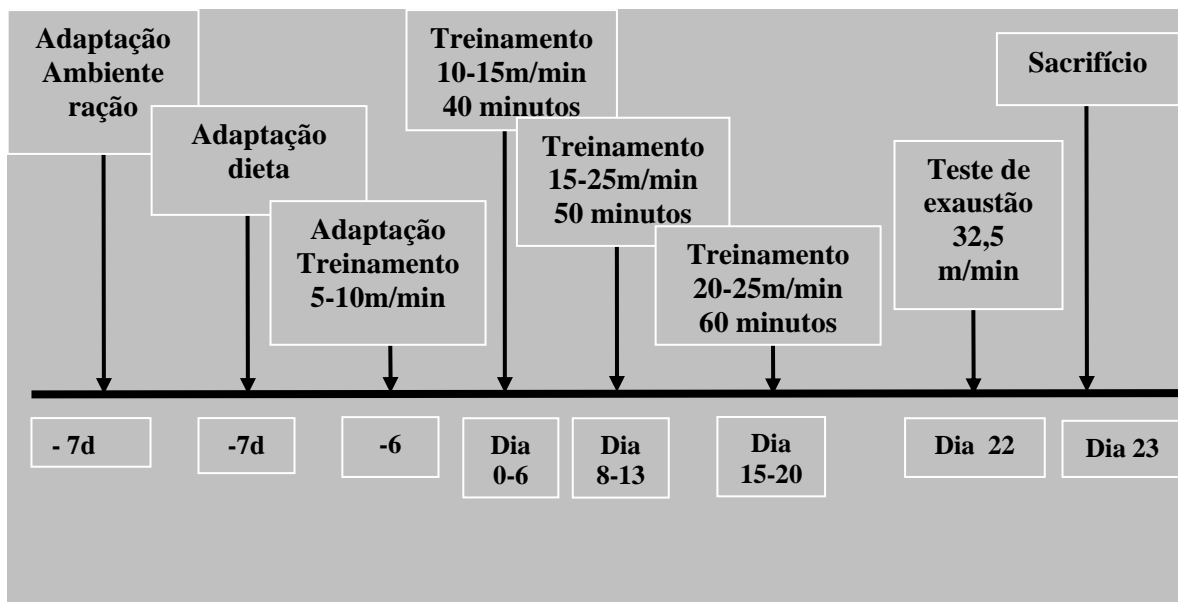


Figura 3.2. Esquema do protocolo de treinamento

3.2.5. Preparação da Fração Intestinal

A preparação do intestino foi realizada conforme o método adaptado descrito por Brennan et al. (1975). O intestino delgado foi retirado imediatamente após o sacrifício dos animais, e mantido em solução tampão fosfato a 37°C. Seguidamente, o lúmen foi lavado com solução tampão fosfato e um dos extremos amarrado e uma alíquota de 5mL da solução protéica (37,5mg /mL) foi infundida no seu interior, com seringa, e a outra extremidade foi fechada, permanecendo o intestino em 20mL de solução fisiológica por

duas horas, na temperatura de 37°C. Passado este período, foram coletados os meios líquidos internos e externos para serem analisados por cromatografia e eletroforese capilar.

3.2.6 Eletroforese Capilar

Os perfis peptídicos foram determinados por eletroforese capilar em sistema tampão apropriado (McLAUGHLIN et al. 1992; ZHU et al. 1989). As amostras foram diluídas em água Milli-Q e homogeneizadas, filtradas em membrana de acetato de celulose 22micras e injetadas durante 7 segundos, com pressão de 40mBar, em capilar de sílica fundida (51,5cm x 75 micras d.i.). O tampão de corrida usado foi o tampão fosfato 900mM, pH 1,85 e fluxo de corrente do catodo para o anodo. Entre as análises, o capilar foi pós-condicionado com água por 1,5 minutos, em seguida foi passada solução de hidróxido de sódio 1N por 1 minuto, e mais 2 minutos de água, e para finalizar foi condicionado com tampão de corrida por 2,5 minutos. As corridas foram conduzidas à temperatura de 30°C em aparelho Hewlett Packard-3DCE (Agilent, Waldbronn, Germany), com tensão mantida a 25,5 kV, sendo absorbância monitorada a 191nm.

3.2.7 Determinação de Aminoácidos livres por Cromatografia Líquida

A análise aminoácídica (WHITE et al., 1986; HANGEN et al., 1989) do conteúdo dos líquidos internos e externos foram primeiramente hidrolisados com ácido clorídrico 6N com fenol, a 110°C durante 24 horas. Os aminoácidos liberados na hidrólise ácida foram tratados com fenilisotiocianato (PITC), separados por HPLC em fase reversa e detectados em UV a 254nm. A quantificação foi feita por calibração interna multinível, com auxílio do

ácido α -aminobutírico (AAAB) como padrão interno.

Em seguida as amostras foram desproteinizadas com metanol (grau HPLC) 99% a uma proporção de uma parte de metanol para uma parte de amostra e centrifugada, e os aminoácidos que ficaram no sobrenadante foram tratados com fenilisotiocianato (PITC), e separados por HPLC em fase reversa e detectados em UV a 254nm. Posteriormente a quantificação foi realizada por calibração interna multinível, com auxílio do ácido α -aminobutírico (AAAB) como padrão interno, no aparelho da Pickering (E.U.A.).

3.2.8 Mensuração de peptídeos por Cromatografia Líquida

A mensuração cromatográfica (CHABANET e YVON, 1992) realizada no aparelho Pichering (E.U.A.), usando a coluna Luna 5u C₁₈ (100 μ m), 250 x 4,6mm I.D. A separação foi atingida por um gradiente linear entre uma fase A móvel (ácido-água trifluoracético, 0,11%), e fase B (0,1% ácido trifluoracético, em acetronitrila e água – 60:40). O fluxo foi de 1mL/minuto, o gradiente de acetronitrila de 1,2%, e a temperatura na coluna estava em 30°C, e a detecção em UV a 254nm.

As análises de peptídeos só foram realizadas com o grupo treinado, devido à insuficiência de amostras.

3.3 Resultados e Discussão

No presente trabalho, os animais foram alimentados com proteínas de alto peso molecular (isolado do soro do leite) e com um hidrolisado enzimático dessa mesma proteína. As fontes protéicas continham os mesmos aminoácidos e, portanto, as diferenças restringiam-se apenas às características físico-químicas. Os animais também foram submetidos a treinamento físico, ao final do qual metade dos animais foram levados à exaustão, com o objetivo de analisar os perfis de aminoácidos e peptídeos nos líquidos interno e externo dos intestinos, após infusão com as soluções ou suspensões protéicas.

Pode-se observar, conforme apresentado na Figura 3.1., o crescimento contínuo e normal de todos os animais. Foi constatado que não houve diferença significativa entre os animais alimentados com isolado ou hidrolisado durante a fase de alimentação e treinamento. As duas dietas proporcionaram balanço nitrogenado positivo, para o isolado foi de $0,81 \pm 0,17\text{g}$ de nitrogênio/dia e para o hidrolisado valor de $0,83 \pm 0,17\text{g}$ de nitrogênio/dia.

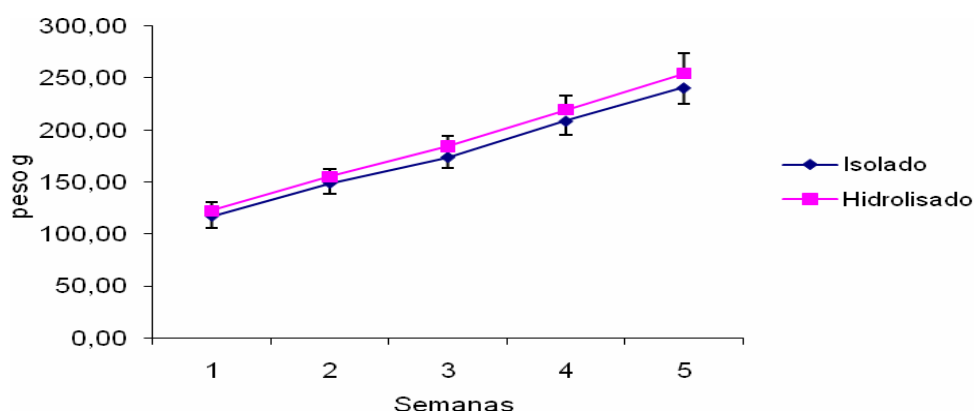


Figura 3.3. Evolução ponderal dos animais alimentados com duas diferentes fontes protéicas durante cinco semanas de experimento.

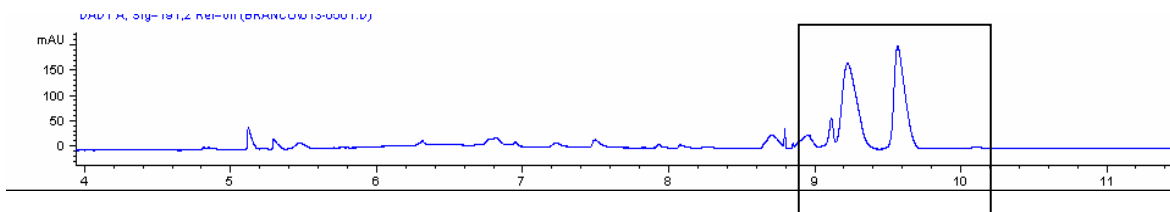
Em relação ao consumo de dieta pelos animais, não foi registrada diferença significativa entre os diferentes grupos de atividade. Para o grupo treinado-exausto, o consumo médio foi de $16,39 \pm 0,31\text{g}$; para o grupo sedentário-exausto, o valor foi de $15,45 \pm 0,62\text{g}$; para o grupo treinado foi de $15,20 \pm 0,01\text{g}$ e, para o grupo sedentário, o consumo médio foi de $15,98 \pm 0,54\text{g}$.

Verificou-se ainda que as fontes protéicas ‘isolado’ e ‘hidrolisado’ do soro de leite não se diferenciaram entre si na sua capacidade de promover o crescimento, proporcionando, portanto, crescimentos indistinguíveis para os animais, mesmo em diferentes níveis de atividade física. Posteriormente, foi realizada uma análise *in vitro* para verificar as eventuais mudanças nos perfis de aminoácidos e de peptídeos presentes nos líquidos internos e externos das alças intestinais, após a infusão com solução protéica de isolado e hidrolisado.

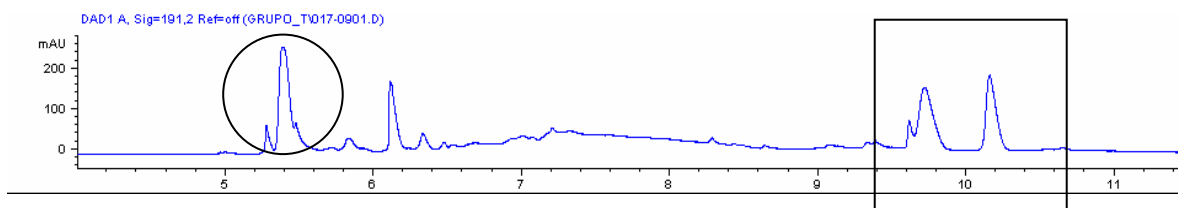
No caso das infusões com o hidrolisado, não foi possível termos um quadro de respostas coerente, pois a solubilidade do hidrolisado do soro do leite, contrário ao observado com a maioria das proteínas hidrolisadas, há uma perda de solubilidade que afeta a análise se ela depender desta característica. Os eletroferogramas obtidos neste caso mostraram baixíssimas quantidades de peptídeos, não sendo possível chegar a uma conclusão, até o momento de reunir todos os dados.

Estes dados sugerem, no entanto, que peptídeos gerados, mesmo por uma digestão incompleta no intestino delgado, são capazes de passar para o lado seroso do intestino, via algum meio de transporte ou difusão, de tal forma que possam ser detectados no exterior da parede intestinal. O fenômeno foi evidenciado em ratos que tinham passado por período de recuperação de 24 horas.

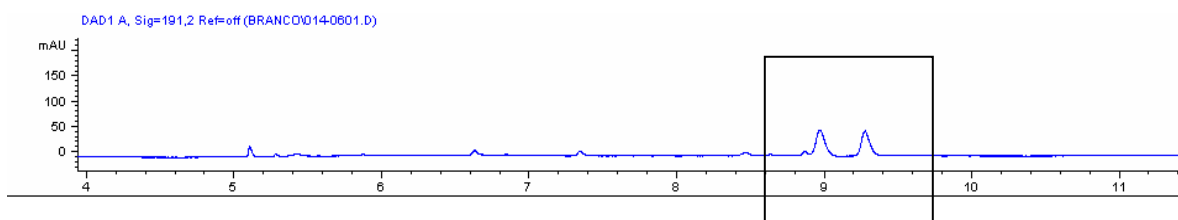
A) Líquido interno, após infusão com água destilada (branco).



B) Líquido interno, após infusão com solução protéica de isolado do soro do leite.



C) Líquido externo, após infusão com água destilada (branco).



D) Líquido externo, após infusão com solução protéica de isolado do soro do leite.

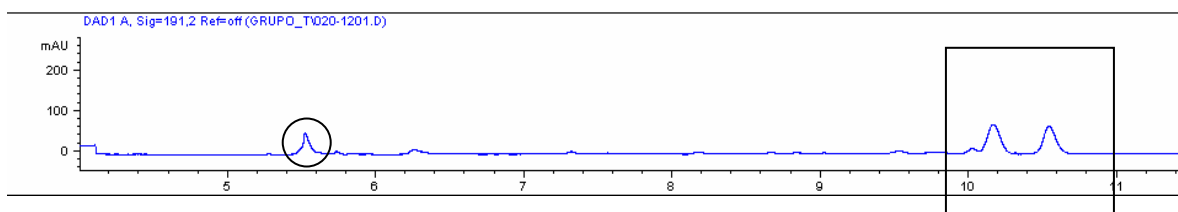


Figura 3.4 Análise eletroforética nos líquidos intestinais, interno e externo (perfusado), do grupo treinado.

Em seguida, as soluções coletadas foram analisadas por cromatografia líquida em fase reversa, utilizando um sistema de solventes apropriado para aminoácidos e outras espécies de compostos nitrogenados, verificando-se a presença de perfis de aminoácidos livres nos líquidos de todos os grupos, além de uma série de picos, provavelmente correspondendo a peptídeos. Os aminoácidos foram facilmente identificados pelas suas características cromatográficas típicas e foram quantificados, utilizando aminoácidos padrão. Para determinar se os demais picos eram de fato peptídeos, estes foram hidrolisados, submetendo o extrato todo a tratamento com HCl 6M e procedendo-se a nova cromatografia específica para aminoácidos totais. Para analisar as relações dos aminoácidos do conteúdo do líquido intestinal, tanto interno quanto externo, os valores do externo foram multiplicados pelo fator de diluição (4X), para efetuar as comparações com o líquido interno. Os aminoácidos referentes aos brancos foram previamente deduzidos (descontados) dos valores brutos encontrados para os intestinos que receberam a infusão protéica.

A Figura 3.5 mostra os perfis de aminoácidos livres coletados dos líquidos interno e externo de alças intestinais de animais que tinham sido sedentários e sedentários-exaustos, infundidos com o isolado do soro de leite. Nesta figura, pode-se observar que, para os animais sedentários, a arginina foi o único aminoácido que esteve presente em maior quantidade no líquido externo, enquanto que todos os demais estavam presentes em maior quantidade no líquido interno. Notou-se, porém, quando estes animais foram levados à exaustão, às alças não mais exibiram transporte de aminoácidos, sugerindo que a exaustão destes animais pode ter diminuído ainda mais a capacidade de hidrólise e/ou transporte de produtos da digestão, mesmo tendo esta sido incipiente.

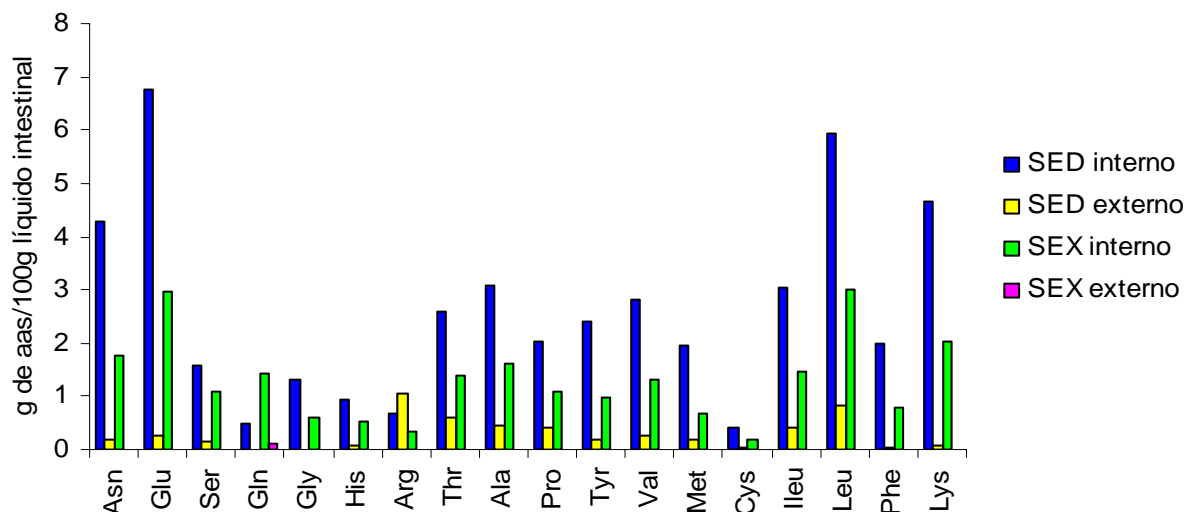


Figura 3.5. Relação dos perfis de aminoácidos livres coletados do interior e exterior de alças intestinais, após infusão com o isolado do soro do leite. As alças foram extraídas de animais que tinham sido alimentados durante cinco semanas com isolado e pertenciam ao grupo sedentário e sedentário-exausto. Asn, asparagina; Glu, glutamato; Ser, serina; Gln, glutamina; Gly, glicina; His, histidina; Arg, arginina; Thr, treonina; Ala, alanina; Pro, prolina; Tyr, tirosina; Val, valina; Met, metionina; Cys, cisteína; Ileu, isoleucina; Leu, leucina; Phe, fenilalanina; Lys, lisina; SED, sedentário; SEX, sedentário exausto.

Na Figura 3.6 é apresentada a comparação dos perfis de aminoácidos livres (líquidos interno e externo) obtidos das alças perfusadas dos grupos treinado e treinado-exaurido, que foram infundidas com isolado. Observou-se que os intestinos dos treinados permitiram a passagem preferencial dos aminoácidos glicina, arginina, treonina, alanina, prolina e tirosina para o líquido externo. O restante dos aminoácidos, nos treinados, teve maior presença no líquido interior intestinal. Nos animais submetidos à exaustão física (treinados-exaustos), notou-se a ausência da maioria dos aminoácidos no líquido externo. Excetuou-se apenas o ácido aspártico.

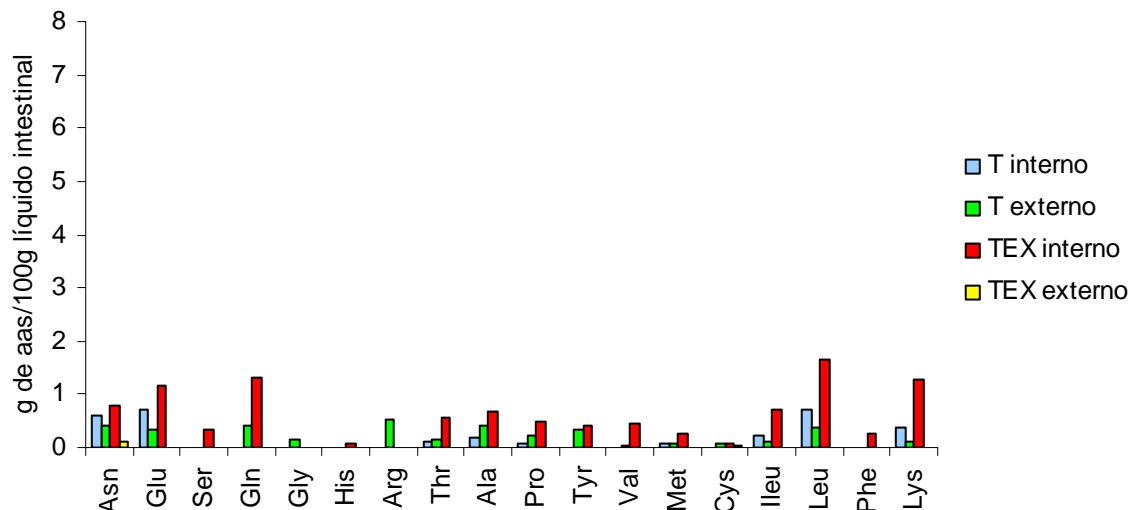


Figura 3.6. Relação dos perfis de aminoácidos livres coletados do interior e exterior de alças intestinais, após infusão com o isolado do soro do leite. As alças foram extraídas de animais que tinham sido alimentados durante cinco semanas com isolado e pertenciam ao grupo treinado e treinado-exausto. Asn, asparagina; Glu, glutamato; Ser, serina; Gln, glutamina; Gly, glicina; His, histidina; Arg, arginina; Thr, treonina; Ala, alanina; Pro, prolina; Tyr, tirosina; Val, valina; Met, metionina; Cys, cisteína; Ileu, isoleucina; Leu, leucina; Phe, fenilalanina; Lys, lisina; T, treinado; EX, treinado exausto.

A Figura 3.7 mostra os perfis de aminoácidos livres coletados dos líquidos interno e externo de alças intestinais de animais que tinham pertencido aos grupos sedentário e sedentário-exausto e que foram infundidas com o hidrolisado. Observou-se a presença da maioria dos aminoácidos no líquido interno para os animais sedentários, com exceção dos aminoácidos, serina e cisteína, que apareceram em maiores quantidades no líquido externo. Após os animais terem sido submetidos à exaustão física, notou-se aumento da passagem de aminoácidos para o líquido externo, tanto em número, quanto em massa. Excetuaram-se, no entanto, os aminoácidos aspártico, glutâmico e glicina, que ainda sendo encontrados no perfusado, estavam presentes em maior concentração no líquido interno. Cabe destacar que,

dos 14 aminoácidos que tiveram maior expressão no perfusado, a arginina foi o que estava em maiores concentrações, na relação interno externo.

Estes resultados sugerem que a exaustão influenciou a fisiologia dos animais de modo a responderem de forma oposta frente à utilização da fonte protéica. Aparentemente, o hidrolisado se diferenciou do isolado no sentido de que os aminoácidos indispensáveis, incluindo a leucina, se fizeram biodisponíveis mais rapidamente quando a fonte protéica estava pré-hidrolisada.

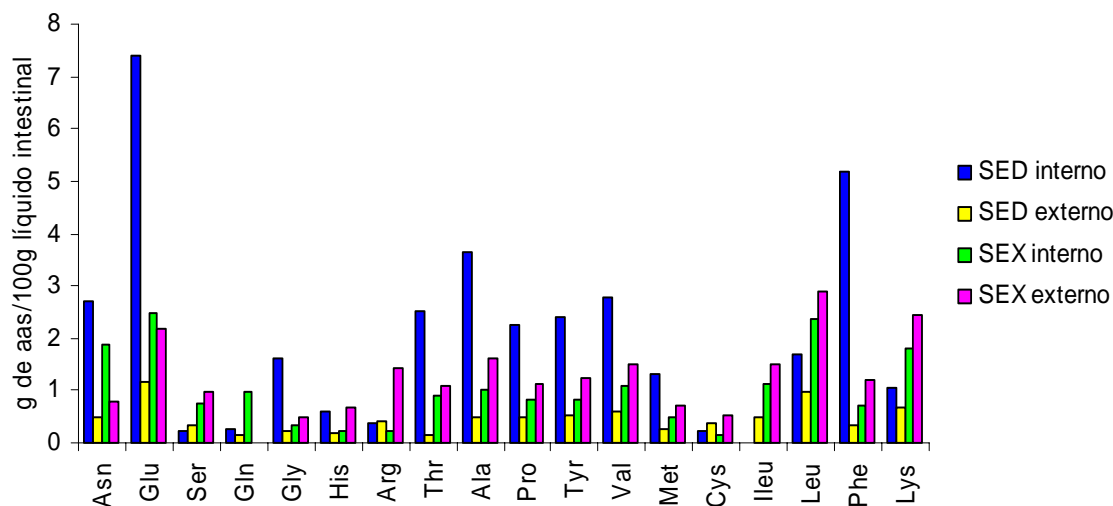


Figura 3.7. Relação dos perfis de aminoácidos livres coletados do interior e exterior de alças intestinais, após infusão com o hidrolisado do soro do leite. As alças foram extraídas de animais dos grupos sedentários e sedentários-exaustos, que tinham sido alimentados durante cinco semanas com hidrolisado. Asn, asparagina; Glu, glutamato; Ser, serina; Gln, glutamina; Gly, glicina; His, histidina; Arg, arginina; Thr, treonina; Ala, alanina; Pro, prolina; Tyr, tirosina; Val, valina; Met, metionina; Cys, cisteína; Ileu, isoleucina; Leu, leucina; Phe, fenilalanina; Lys, lisina; SED, sedentário; SEX, sedentário exausto.

A Figura 3.8 mostra os perfis de aminoácidos livres coletados dos líquidos interno e externo de alças intestinais de animais que pertenciam aos grupos treinados e treinados-exaustos e que foram infundidas com o hidrolisado. Ao cabo de duas horas, observou-se a inexistência de aminoácidos livres no líquido interno e a presença da maioria dos aminoácidos no líquido externo, com exceção de dois aminoácidos, glutamina e arginina, que também não estavam presentes no líquido interno. Esta observação sugere que quaisquer aminoácidos livres inicialmente presentes no interior, podiam ter sido transportados através do epitélio durante o período de incubação. Após estes animais serem submetidos à exaustão física, notou-se uma diminuição da maioria dos aminoácidos no líquido externo, em relação ao simples treinamento. Excetuaram-se a serina e a arginina, que aumentaram consideravelmente, e aspártico, histidina, glicina e cisteína que permaneceram praticamente inalterados.

Dessa forma, para os animais treinados, a exaustão teve um efeito negativo na absorção de aminoácidos, pois houve diminuição na concentração dos aminoácidos no exterior do intestino, quando comparados com os animais apenas treinados. Esta observação pode guardar alguma relação com a diminuição encontrada na atividade da glutaminase intestinal (Capítulo 2, Figura 2.4) para os animais treinados, alimentados com o hidrolisado, após serem levados à exaustão.

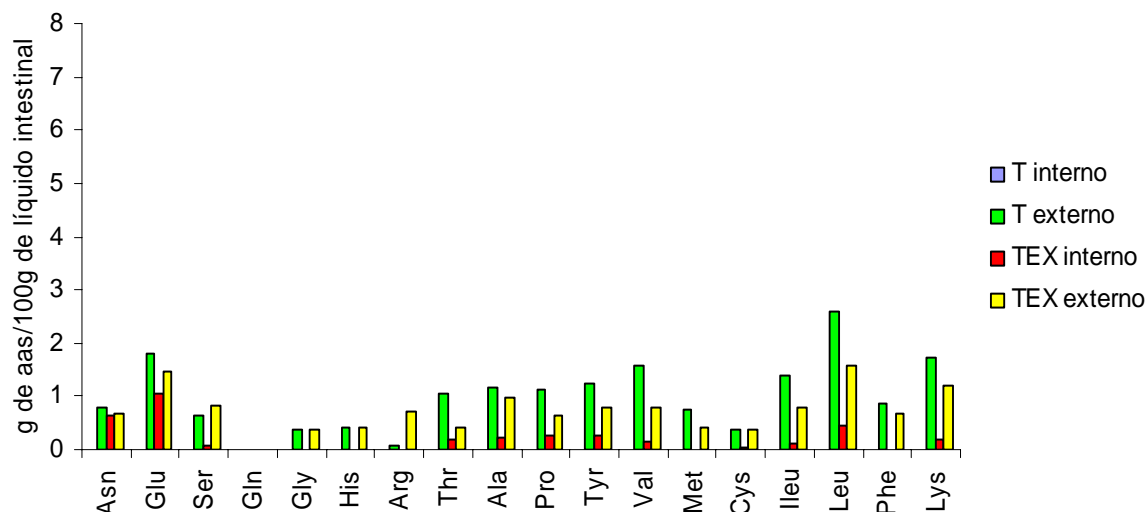


Figura 3.8. Relação dos perfis de aminoácidos livres coletados do interior e exterior de alças intestinais, após infusão com o hidrolisado do soro de leite. As alças foram extraídas de animais dos grupos treinados e treinados-exaustos, que tinham sido alimentados durante cinco semanas com o hidrolisado. Asn, asparagina; Glu, glutamato; Ser, serina; Gln, glutamina; Gly, glicina; His, histidina; Arg, arginina; Thr, treonina; Ala, alanina; Pro, prolina; Tyr, tirosina; Val, valina; Met, metionina; Cys, cisteína; Ileu, isoleucina; Leu, leucina; Phe, fenilalanina; Lys, lisina; T treinado; TEX, treinado exausto.

Após duas horas da injeção da solução protéica com o hidrolisado do soro do leite no intestino, observou-se alteração na concentração dos aminoácidos indispensáveis, para quase todos os diferentes níveis de atividade física, com exceção para os animais sedentários. Tal efeito não foi observado com a infusão com isolado do soro do leite. Após a alimentação, Daenzer et al. (2001) observaram diferença na concentração dos aminoácidos indispensáveis. Este estudo testou a diferença no processo metabólico de animais alimentados com caseína e outros com mistura de aminoácidos que simulavam a composição da primeira, passado uma e três horas, após o consumo da caseína e da dieta com aminoácidos, verificou-se aumento na concentração plasmática de todos os

aminoácidos indispensáveis. E só para dieta com caseína não houve alteração pós-prandial nos conteúdos da fenilalanina, treonina e tirosina.

Para verificar a biodisponibilidade ou transporte dos aminoácidos através do epitélio intestinal, compararam-se as relações de passagem dos aminoácidos que foram gerados durante a incubação com o isolado e o hidrolisado. Observou-se que a dieta com hidrolisado resultou em maiores quantidades de aminoácidos que migraram para o líquido externo. Este fato destacou-se nos grupos sedentários-exaustos e treinados, enquanto que o menor nível de aminoácidos no perfusado foi observado no grupo sedentário. Isto é compatível com a noção de que a atividade transportadora ou absorptiva do intestino do animal sedentário é baixa e adequada apenas para um nível de atividade biológica próxima do basal.

Em relação à infusão com isolado, a situação foi inversa. Observou-se menor nível de aminoácidos no líquido perfusado dos animais sedentários-exaustos e treinados e, maiores níveis no grupo sedentário. Neste caso, os dados sugerem que o exercício exaustivo, seja ele a partir da condição sedentária ou treinada, leve a um esgotamento, bem seja da capacidade digestiva ou da absorptiva. Não foram encontrados outros trabalhos que dêem suporte a este achado.

Em geral, e em relação aos animais sedentários-exaustos e treinados-exaustos com infusão de isolado, pode se dizer que não houve nenhuma passagem de aminoácidos. Assim, quando as alças foram infundidas com as proteínas pré-hidrolisadas, seria possível se obter vantagem na passagem de aminoácidos e/ou peptídeos pela mucosa intestinal. Era esperado que os aminoácidos encontrados no perfusado do isolado estivessem em

concentrações menores do que no caso do hidrolisado, pois o substrato não digerido no intestino delgado iria gerar pouco aminoácido livre.

Altas concentrações de leucina foram observadas (Figura 3.7 e 3.8), principalmente, após a infusão de solução de hidrolisado. Esta alta concentração pode ser explicada pelos altos teores de leucina na fonte protéica utilizada (isolado $12,3 \pm 0,08$ e hidrolisado $10,2 \pm 0,9$). Concentração elevada de leucina é benéfica para praticantes de atividade física, pois estudos sugerem que a leucina estaria envolvida na ativação da síntese protéica (ANTHONY et al., 2001). Com isso, os dados sugerem então que a melhor forma de administração da proteína do soro de leite para praticantes de atividade seja na forma pré-hidrolisada, mesmo que os dados do rendimento físico (tempo de exaustão) não tenham mostrado diferença significativa entre o hidrolisado e o isolado.

Na Figura 3.9 mostra os perfis aminoacídico de substâncias portadoras de aminoácidos (provavelmente peptídeos) coletados dos líquidos interno e externo de alças intestinais de animais treinados, infundidas com isolado ou hidrolisado. Para tais valores foram descontados os aminoácidos referentes aos brancos e os aminoácidos livres dos valores brutos. Para analisar as relações dos aminoácidos do conteúdo do líquido intestinal, tanto interno quanto externo, os valores do externo foram multiplicados pelo fator de diluição (4X), para efetuar as comparações com o líquido interno.

A Figura 3.9, mostram-se que as alças infundidas com o isolado terminaram o período de incubação com níveis consideravelmente mais elevados de substâncias portadoras de aminoácidos (presumivelmente peptídeos) no conteúdo interno do que no externo, enquanto que as alças infundidas com hidrolisado mostraram maiores níveis de tais substâncias no líquido externo. Foi observado que a passagem de substâncias contendo

aminoácidos foi diferente para alguns aminoácidos quando o material infundido foi o hidrolisado de soro do leite ou o isolado. E

Permanecendo nas mesmas concentrações no líquido externo para as ambas infusões os aminoácidos aspártico, serina, glicina, treonina e tirosina.

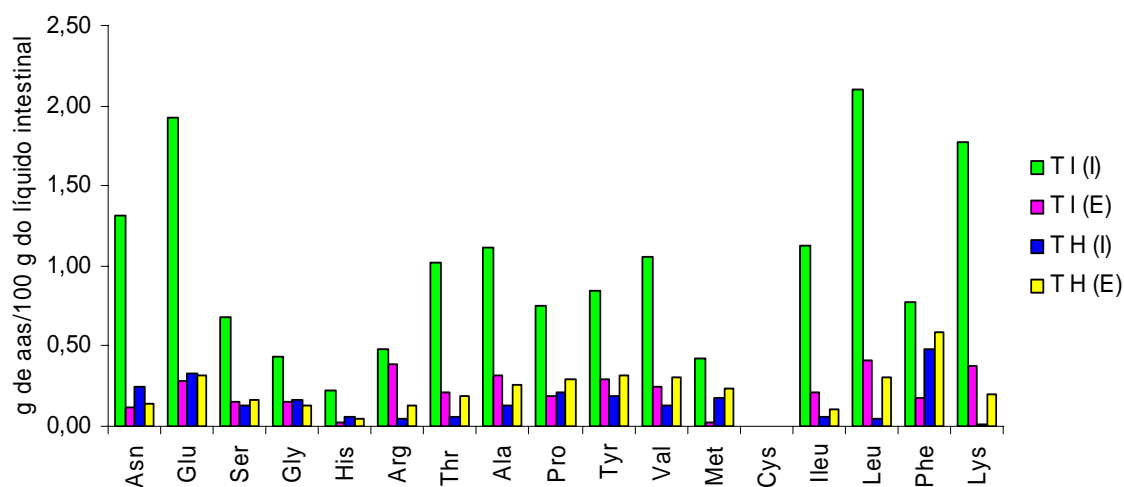


Figura 3.9. **Perfil aminoacídico dos possíveis peptídeos perfusados através do intestino. Perfil diferencial de aminoácidos resultante de subtrair os aminoácidos livres dos totais contidos nos líquidos interno (I) e externo (E) das alças intestinais infundidas com isolado e hidrolisado. Os animais haviam sido alimentados com isolado e hidrolisado, respectivamente, durante cinco semanas.** Asn, asparagina; Glu, glutamato; Ser, serina; Gln, glutamina; Gly, glicina; His, histidina; Arg, arginina; Thr, treonina; Ala, alanina; Pro, prolina; Tyr, tirosina; Val, valina; Met, metionina; Cys, cisteína; Ileu, isoleucina; Leu, leucina; Phe, fenilalanina; Lys, lisina; T I (I) = treinado, infundido com isolado, interno; T I (E) = treinado, infundido com isolado, externo; T H (I) = treinado, infundido com hidrolisado, interno; T H (E) = treinado, infundido com hidrolisado, externo.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que houve mudança na absorção dos produtos da digestão das proteínas, quando administradas na forma pré-hidrolisada, em comparação à forma intacta, e também que o nível de atividade física pode influenciar o processo de absorção de forma a produzir efeitos semelhantes entre si, em alguns dos casos.

Portanto, sugere-se que a qualidade da proteína alimentar não seja tão somente avaliada pela sua composição em aminoácidos e a correspondente digestibilidade (FAO/WHO-1992). Mediante este estudo e através de observações recentes, tem sido demonstrado que o tipo da proteína (caseína ou soro do leite), além da forma (aminoácido livre, peptídeos ou proteínas), são fatores que afetam alguns processos bioquímicos no organismo: a oxidação das proteínas no corpo, a absorção dos aminoácidos pelo fígado, além da própria biossíntese de proteínas. Essas observações sugerem que tais variáveis poderiam ser consideradas também para avaliar a qualidade da proteína (METGES et al., 2000; MAHEM et al., 1996; BOIRIE et al., 1996).

3.4 CONCLUSÃO

O presente estudo concluiu que quando o material pré-hidrolisado foi infundido no intestino de ratos sedentários, foi evidenciado que a exaustão causou algum tipo de estímulo ou facilitação ao transporte de aminoácidos através da parede intestinal, a ponto de observar-se de duas a três vezes mais aminoácidos no perfusado do animal exaurido do que no não exaurido. Já o efeito contrário foi observado no caso dos intestinos dos ratos treinados e treinados-exauridos, com relação à exaustão e a infusão do hidrolisado. Em relação à infusão com isolado do soro do leite, foi clara a presença de poucos aminoácidos no líquido externo, após a incubação. Entretanto, o fato de apresentarem-se apenas uns poucos aminoácidos (treonina, prolina e alanina) no perfil dos livres, pode significar que a sua liberação seletiva foi objeto da ação de exopeptidases, tendo em conta que substratos constituídos de proteínas íntegras não passaram por um processo de hidrólise estomacal prévia.

As análises não permitem afirmar se o tipo de alimentação (proteína intacta ou hidrolisada) trouxe algum efeito para a biodisponibilidade dos aminoácidos. Só foi possível concluir que os intestinos que foram infundidos com hidrolisado tiveram maiores concentrações de aminoácidos passando para o líquido externo. Estudos futuros serão necessários para elucidar o real mecanismo de absorção de aminoácidos e de peptídeos, para as diferentes formas físico-químicas em que a proteína é apresentada, e verificar também se há mudança no processo de digestão e de absorção mediante a ação da atividade física.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADIBI, S.A.; Mercer, D.W. Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. **The Journal of Clinical Investigation**, v.52, p. 1586-1594, 1973.
2. ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27,n.6, p.1256-1262, 1979.
3. ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; KIMBAL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Signaling pathways involved in translation control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **The Journal Nutrition**, v.131, n.3, p.856-860, 2001.
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**, 16th ed. AOAC International, Maryland, USA (1997).
5. ATHERTON, H.V.; NEWLANDER, J. A. A.O.A.C. Method 989.05. Mojonier: Fat in milk. In: **Chemistry and testing of dairy products**, 4th ed., Westport, Connecticut, 1996.
6. BILLEAUD, C.; GUILLET, J.; SANDLER, B. Gastric emptying in infants with or without gastro-oesophageal reflux according to type of milk. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.44, p.577-583, 1990.
7. BJORCK, L.A. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on phyctrophic bacteria in milk. **Journal of Dairy Research**, v.45, p.109-118, 1978.

8. BORIE Y.; DANGIN, M.; GACHON, P.; VASSON, M.; MAUBOIS, J.; BEAUFRERE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.94, n.7, p.14930-14935, 1997.
9. BRENNAN, F.T.; ARBAKOV, D.; STEFANKIEWICZ, J.S.; GROVES, W.G. Acid-secretory effects of pentagastrin, histamine, urecholine, DBcAMP, and cGMP in isolated stomachs of fed and fasted rats. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v.149, p.725-730, 1975.
10. CHABANET, C.; YVON, M. Prediction of peptide retention time in reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.599, n.1-2, p.211-225, 1992.
11. DAENZER, M.; PETZKE, K.J.; BEQUETTE, B.J.; METGES, C.C. Whole-body nitrogen and splanchnic amino acid metabolism differ in rats fed mixed diets containing casein or its corresponding amino acid mixture. **The Journal of Nutrition**, v.131, p.1965-1972, 2001.
12. FAO/WHO. Protein Quality Evaluation, Report of joint FAO/WHO expert consultation. In: **FAO Food and Nutrition Paper**, v.51, p.1-66, Rome, Italy, 1992.
13. HÁ, E.; ZEMEL, M.B. Function properties of whey. Whey components and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.14, n.5, p.251-258, 2003.
14. HANGEN, S.R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of amino-acids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n.6, p.912-916, 1989.

15. KINSELA, J.E., WHITEHEAD, D.M., Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.33, p.343-348, 1989.
16. KUSSENDRAGER, K.D.; VAN HOOIJDONK, A.C. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. **The British Journal of Nutrition**, v.84, n.1, p.19-25, 2000.
17. LIANG, R.; FEI, Y.J.; PRASAS, P.D.; RAMAMOORTHY, S.; HAN, H.; YANG-FENG, T.L.; HEDIGER, M.A.; GANAPATHY, V.; LEIBACH, F.H. Human intestinal H⁺ / peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.12, p.6456-6463, 1995.
18. LONNERDAL, B. Nutrition and physiologic significance of human milk proteins. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n.6, p.1537-1543, 2003.
19. MAHEM, S.; ROOS, N.; BENAMOUZIG, R.; DAVIN, L.; LUENGO, C.; GAGNON, L.; GAUSSERES, N.; RAUTUR, J.; TOME, D. Gastrojejunal kinetics and the digestion of 15-N-beta-lactoglobulin and casein in humans: the influence of nature and quality of the protein. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.63, n.4, p.546-552, 1996.
20. MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review**, v.9, n.20, p.136-156, 2004.
21. McLAUGHLIN, G.M.; NOLAN, J.A.; LINDAHL, J.L.; PALMIERI, R.H.; ANDERSON, K.W.; NARIS, S.C.; MORISON, J.A.; BRONZERT, T.J.; Pharmaceutical drug separations by HPCE: Practical guidelines. **Journal of Liquid Chromatography**, v.15, p.961-1021, 1992.

22. METGES, C.C.; EL-KHOURY, A.E.; SELVARAJ, A.B.; TSAY, R.H.; ATKINSON, A.; REGAN, M.M.; BEQUETTE, B.J.; YOUNG, V.R. Kinetics of L-[1-¹³C] leucine when ingested with free amino acids, unlabeled or intrinsically labeled casein. **The American Journal of Physiology**, v.278, p.1000-1009, 2000.
23. MILLER, M.J.S.; WITHERLY, S.A.; CLARK, D.A. Casein: Milk protein with diverse biologic consequences. **Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.195, n.2, p.143-159, 1990.
24. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 2 ed, São Paulo, 1985.
25. PELLET, P.L.; YOUNG, V.R. Nutrition evaluation of protein foods, Tokyo: The United Nations University, p.154, 1980.
26. PIMENTA, F.M.V., ANBECIA-SORIA, M.I., AULER, F., AMAYA-FARFÁN, J. Physical performance of exercise young rats fed hydrolysed whey protein at a sub-optimal level. **International Dairy Journal**, v.16, p.984-991, 2006.
27. REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. Jr. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.
28. SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades fisiológicas-funcinais das proteínas do soro de leite. *Revista de Nutrição*, v.17, n.4, p.397-409, 2004

29. SHANON, L.K.; CHATTERTON, D.; NIELSEN, K.; LONNERDAL, B. Glycomacropeptide and alfa-lactoalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutrition status in infant rhesus monkeys. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n.5, p.1261-1268, 2003.
30. SMOLKA, M.B.; ZOPPI, C.C.; ALVES, A.A.; SILVEIRA, L.R.; MARANGONI, S.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; NOVELLO, J.C.; MACEDO, D.V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **The American Journal of Physiology –Regulatory, Integrative and Corparative Physiology**, v.279, n.5, p.1539-1545, 2000.
31. VAN LOON, L.J.C.; SARIS, W.H.M.; VERNAHGEN, H.; WAGENAMAKERS, J.M. Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, n.1, p.96-105, 2000.
32. WALZEM, R.L.; DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Whey components: Millenia of evolution create functionalities for mammalian nutrition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.42, n.4, p.353-375, 2002.
33. WHITE, J.A.; HART, R.J.; KRY, JC. An evaluation of the waters pico-tag system for the amino acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n.4, p.170-177,1986.
34. WIT, J.N. Nutrition and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.3, p.597-608, 1998.
35. ZHU, M.; HANSEN, D.; BURD, S.; HVERBNER, V.; BALASUBRAMANIAN, P.; CHEN, A.J.C. Use of high performance eletrophoresis in monitoring peptide synthesis. **Bio-Rad Bulletin**. 1482, 1989.

APÊNDICE

Composição da dieta

Tabela 1 – A formulação-base da dieta foi a AIN 93-G, modificada para conter 12% de proteína, sendo utilizados como fonte protéica o isolado do soro do leite, seu hidrolisado e a caseína.

Ingredientes	caseína (g)	Isolado (g)	Hidrolisado (g)
Amido de milho	456.486	464.486	456.486
Caseína	141.00	---	---
Isolado	---	133.000	---
Hidrolisado	---	---	141.000
Amido dextrinizado	132.000	132.000	132.000
Sacarose	100.000	100.000	100.000
Óleo de soja	70.000	70.000	70.000
Fibra	50.000	50.000	50.000
Mistura mineral	35.000	35.000	35.000
Mistura vitamínica	10.000	10.000	10.000
L-cistina	3.000	---	---
Bitartarato de colina	2.500	2.500	2.500
Ter-bitilhidroquiona	0.014	0.014	0.014
Total	1000.00 g	997.00	997.00

Tabela 2 – Composição da mistura vitamínica (AIN-93G) utilizada na preparação das dietas experimentais.

Vitaminas	g/Kg mistura
Ácido nicotínico	3.000
Pantotenato de cálcio	1.600
Piridoxina-HCL	0,700
Riboflavina (80%)	0,600
Ácido fólico	0,200
D-biotina (2% em CaCO ₃)	0,020
Vitamina B-12 (cianocobalamina) (1% em maltodextrina)	2.500
Vitamina E (α -tocoferol – 500UI/g)	15.000
Vitamina A (all-trans-retinil palmitato – 500.000UI/g)	0,800
Vitamina D-3 (colecalfiferol – 500.000UI/g)	0,250
Vitamina K (filiquinona)	0,075
Açúcar refinado (ou dextrina)	974.655

Tabela 3. Composição da mistura mineral (AIN-93G) utilizada na preparação das dietas experimentais.

Minerais	g/kg mistura
Carbonato de cálcio, anidro 40,04% Ca	357,00
Fosfato de potássio, monobásico, 22,76% P; 28,73% K	196,00
Citrato de potássio, tri-potássio, monoidratado 36,16% K	70,78
Cloreto de sódio, 39,34% Na; 60,66% Cl	74,00
Sulfato de potássio, 44,87% P; 18,39% S	46,60
Óxido de magnésio, 60,32% Mg	24,00
Citrato férrico, 16,50% Fe	6,06
Carbonato de zinco, 52,14% Zn	1,65
Carbonato de manganês, 47,79% Mn	0,63
Carbonato cúprico, 57,47% Cu	0,30
Iodeto de potássio, 59,3% I	0,01
Selenito de sódio, anidro 41,79% Se	0,01025
Paramolibdato de amônia, tetraidratado 54,34% Mo	0,00795
Metasilicato de sódio, monoidratado 9,88% Si	1,45
Sulfato de potássio e crômio dodecaidratado, 10,42% Cr	0,275
Cloreto de lítio, 16,38% Li	0,0174
Ácido bórico, 17,5% B	0,0815
Fluoreto de sódio, 45,24% F	0,0635
Carbonato de níquel, 45% Ni	0,0318
Vanadato de amônia, 43,55% V	0,0066
Sacarose em pó	221,026



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 841-1, sobre "EFEITOS DO CONSUMO DE PROTEOLISADO DO SORO DE LEITE NO ESTÔMAGO, CORAÇÃO, INTESTINO E PÂNCREAS DE RATOS JOVENS EXERCITADOS EM ESTEIRA" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán / Iara Ribeiro Carvalho / Ana Cláudia Coelho Nery está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 08 de junho de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 841-1, entitled "EFFECTS OF THE INTAKE OF MILK WHEY PROTEIN HYDROLYSATE IN THE STOMACH, HEART, INTESTINE AND PANCREAS OF YOUNG RATS EXERCISED IN THE TREADMILL", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on June 8, 2005.

Campinas, 08 de junho de 2005.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonzo
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
CEP - 13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE 55 19 3788-6359
FAX 55 19 32893124

UNICAMP - FEA-EXPERIMENTAL - 15-Jun-2005 - 13:49:00/46-1/1